

374-88-07/01

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCCEN

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mob

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie

Option : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Thème

CARACTERISATION DE LA
 RESISTANCE AUX β -LACTAMINES
 DES SOUCHES CLINIQUES DE
Pseudomonas aeruginosa
 ISOLEES A L'HÔPITAL DE TLEMCCEN

Présenté par Monsieur REBIAHI Sid-Ahmed

Soutenu le 11 Février 2002

Devant le jury composé de

Mr M. KAJIMA	Professeur, Université de Tlemccen	President
Mr N. KARAM	Professeur, Université d'Oran	Examineur
Mr D.E. ABDELOUAHED	Chargé de Cours, Université de Tlemccen	Examineur
Mr R. BAKOUR	Professeur, USTHB - Alger	Promoteur

Année Universitaire : 2001 - 2002

Remerciements

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur R. BAKOUR, Professeur en génétique à l'Institut de Biologie U.S.T.H.B., Bab Ezzouar, ses conseils judicieux sa perspicacité et son sérieux ont été pour moi l'unique repère, puisse-t-il trouver ici un témoignage de ma profonde gratitude.

Je témoigne ma reconnaissance à Monsieur M. KAJIMA, Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, qui a accepté de présider ce jury.

Je remercie vivement Monsieur N. KARAM, Professeur à l'Université d'Es-Sénia d'Oran, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur D.E. ABDELOUAHED, Maître de Conférence à l'Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur DRISSI, Maître Assistant à l'Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, pour son aide et sa présence dans les moments difficiles.

Je remercie profondément tous les membres du laboratoire de génétique de l'U.S.T.H.B. Bab Ezzouar pour l'amitié qu'ils m'ont témoigné et l'aide qu'ils m'ont prodigué, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect. Je cite : M^{me} T. BENIASSINE, M^{elle} Y. MESSAI, M. CHERBAL, M^{elle} Loubna, M^{elle} ZIGHA Nabila et surtout M^{elle} ALLOUACHE Souhila.



Dédicaces

A ma Mère,

A mon Père,

puissent t-ils trouver dans ce travail un hommage à leurs sacrifices

et l'expression de ma profonde affection.

A ma sœur Fatima,

*A ma chère Malika, pour ton dévouement,
mes remerciements seront à jamais impuissants
devant ta générosité, j'en serais toujours
reconnaisant.*

A mes frères : Mohammed, Azedine, Mustapha,

A mon beau frère Hichame,

A tous mes ami(e)s, en particulier Amine.

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION</i>	1
<i>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	4
<i>Bactériologie des souches de Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>I- Le genre Pseudomonas</i>	4
I.1. Caractères généraux du genre <i>Pseudomonas</i>	4
I.2. Position taxonomique	4
I.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
I.4. Caractères cultureux	5
I.5. Caractères biochimiques	6
I.6. Caractères antigéniques	8
I.7. Ecologie et pouvoir pathogène	9
I.8. Les marqueurs épidémiologiques	11
<i>II- Les antibiotiques</i>	12
II. 1. Définition	12
II.2. Classification et mode d'action des antibiotiques	12
II.3. Résistance aux antibiotiques	15
<i>III- Les bêta-lactamines</i>	21
III.1. Historique	21
III.2. Structure et classification des bêta-lactamines	21
III.3. Peptidoglycane et mode d'action des bêta-lactamines	26
III.4. Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines	30
<i>IV. Les bêta-lactamases</i>	39
IV.1. Origine	39
IV.2. Mécanisme d'action	39
IV.3. Classification des bêta-lactamases	41
IV.4. Inhibiteurs de β -lactamases	42

V. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et phénotypes de résistance aux bêta-lactamines	45
V.1. Phénotypes de résistance naturelle	45
V.2. Phénotypes de résistance acquise	45
V. 2. 1. Résistance acquise par production de β -lactamases	46
V. 2. 2. Résistance acquise due à un mécanisme non enzymatique	47
V. 2. 3. Nouveaux phénotypes de résistance	48
V. 2. 4. Phénotypes complexes de résistances acquise	48
VI. Conjugaison bactérienne et curage	49
VI.1. Conjugaison bactérienne	49
VI.2. Elimination des plasmides	50
MATERIELS ET METHODES	52
I. Matériels	52
I.1. Matériel biologique	52
I.2. Milieux de culture	52
I.3. Solutions et tampons	53
II. Méthodes	55
II.1. Prélèvements	55
II.2. Isolement et purification	55
II.3. Identification	55
II.3. 1. Galerie classique	55
II.3.1.1. Test d'oxydase	55
II.3.1.2. Détermination du type respiratoire	56
II.3.1.3. Détermination du type de métabolisme du glucose	56
II.3.1.4. Test des trois sucres	56
II.3.1.5. Détermination de la production de pigments	56
II.3.1.6. Test du mannitol mobilité	57
II.3.1.7. Test de Simmons	57
II.3.1.8. Test de croissance à 42°C	57
II.3. 2. Galerie <i>Pseudomonas</i>	55
II.3.3. Galerie API 20 E	57
II.4. Antibiorésistance	58
II.4.1. Antibiogramme	58
II.4.2. Analyse phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines	59
II.4.3. Test d'induction	61
II.4.4. Test de synergie : Recherche de β -lactamases à spectre élargi	62
II.5. Sérotypage	64

II.6. Détection de β-lactamases	65
II.6.1. Test iodométrique	65
II.6.2. Test acidimétrique	66
II.6.3. Test PADAC	67
II.7. Extraction de l'ADN plasmidique	67
ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	69
II.8 Transfert des plasmides par conjugaison	70
II.9. Curage effectué par des substances chimiques	73
RESULTATS ET DISCUSSION	74
I. Identification	74
II. Prévalence de <i>pseudomonas aeruginosa</i> en fonction du type de prélèvement	78
III. Sérotypage	80
IV. Sensibilité aux antibiotiques	82
4.1. Bêta-lactamines	83
4.2. Les autres antibiotiques	86
V- Phénotypes de résistance	100
VI. Concentrations minimales inhibitrices	103
VII. Corrélation entre les sérotypes et l'antibiorésistance	105
VIII. Détection des β-lactamases	106
IX. Recherche des bêta-lactamases à spectre élargi par le test de synergie	108
X. Recherche du caractère inductible des bêta-lactamases	111
XI. Transfert génétique par conjugaison	111
XII. Curage plasmidique	113
XIII. Analyse plasmidique des souches	114
CONCLUSION	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES	
RESUME	

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Malgré l'arsenal thérapeutique disponible, la pathologie infectieuse reste un véritable problème de santé publique, notamment en Algérie. Cette situation est compliquée, depuis quelques années, par l'augmentation des infections hospitalières dues à des germes, pathogènes opportunistes, à caractère hospitalier, dont *Pseudomonas aeruginosa* en est un exemple édifiant.

Outre les carences en matière d'hygiène hospitalière qui favorisent l'extension de ces maladies, leur prise en charge est contrecarrée par l'émergence en parallèle d'une résistance aux antibiotiques responsable de nombreux échecs thérapeutiques. Cette résistance est principalement le fait d'une pression de sélection, suite à l'utilisation massive et/ou non documentée des antibiotiques. Ainsi depuis quelques années, les cliniciens sont confrontés à des microorganismes réfractaires aux traitements par plusieurs familles d'antibiotiques ; les bêta-lactamines sont les plus représentatives de cette évolution.

La famille des bêta-lactamines constitue un des groupes d'antibiotiques le plus complexe et le plus important en thérapeutique, en raison de la diversité de ses molécules, de leur efficacité et de leur relative faible toxicité.

Malgré la batterie impressionnante de bêta-lactamines (pénames, pénèmes, céphèmes et monolactames), l'extraordinaire pouvoir d'adaptation des bactéries fait que la fréquence des infections bactériennes qui échappent à l'antibiothérapie augmente de façon alarmante partout dans le monde.

La résistance aux bêta-lactamines chez les bactéries à Gram(-), en l'occurrence *Pseudomonas*, peut être due à une diminution du taux de diffusion des bêta-lactamines à travers les porines membranaires, une altération des cibles des antibiotiques appelées Penicillin Binding Proteins (PBPs), un système d'efflux actif ou une synthèse d'enzymes, les bêta-lactamases, inactivant les antibiotiques. Une combinaison synergique entre ces différents modes de résistance peut exister.

Le mécanisme de résistance aux bêta-lactamines le plus courant et le plus efficient réside dans la production par les bactéries de bêta-lactamases capables d'hydrolyser le noyau bêta-lactame, réaction qui conduit à la formation d'un produit dépourvu d'activité biologique.

Ainsi, en plus de la résistance naturelle de *Pseudomonas aeruginosa* à certaines bêta-lactamines, il existe une résistance acquise des souches à l'intérieur des espèces théoriquement sensibles. Cette résistance acquise résulte soit de mutations, soit, le plus souvent, d'un apport de nouveaux gènes par le biais de plasmides ou de transposons ; cette flexibilité génétique est augmentée par les intégrons.

Afin de prévenir les échecs thérapeutiques en permettant des schémas de traitements efficaces et rationnels et essayer de contrôler l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans notre pays, il est essentiel de l'évaluer régulièrement et d'identifier ses supports biochimiques et génétiques. Dans le cas de la résistance aux bêta-lactamines, un intérêt particulier doit être porté aux bêta-lactamases ; il s'agit de déterminer leur part dans cette résistance. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui porte sur l'évaluation de la résistance aux bêta-lactamines de 100 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans le service de chirurgie de l'hôpital de Tlemcen à partir de malades et de l'environnement.

Le choix de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* comme objet d'étude est motivé par sa diversité biologique, son ubiquité, son pouvoir métabolique important, sa plasticité génétique et enfin son implication fréquente dans les infections hospitalières en particulier. De plus, cette espèce, étant un pathogène opportuniste, est considérée comme un bon indicateur de l'utilisation des antibiotiques.

Les étapes de notre travail ont été comme suit :

- Isolement et identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de prélèvements biologiques et de l'environnement.
- Sérotypage des souches
- Evaluation de l'antibiorésistance par l'antibiogramme et la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en milieu liquide.
- Détection de la synthèse de bêta-lactamases par les tests acidimétriques, iodométriques et PADAC ; recherche de leur caractère inductible par le test d'induction et de leur caractère à spectre élargi par le test de synergie.
- Détermination du support génétique par conjugaison, curage et analyse plasmidique.

**DONNÉES
BIBLIOGRAPHIQUES**



BACTERIOLOGIE
DES SOUCHES DE
Pseudomonas aeruginosa

I- LE GENRE *PSEUDOMONAS*

I.1. Caractères généraux du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase positif, mobiles à l'aide de flagelles polaires. Certains ont la capacité de se développer à une température de 42 °C et de sécréter des protéases ainsi que des toxines. (Palleroni, 1984 ; Flournoy, 1984 ; Palleroni, 1992).

Leurs caractères généraux sont réunis dans le tableau 2.

I.2. Position taxonomique

Selon la neuvième édition du Bergey's manual (1986), les *Pseudomonadaceae* appartiennent à la quatrième section des bacilles et cocci à Gram négatif aérobies (Tableau 1).

Tableau 1: Subdivision de la quatrième édition du Bergey's manual, neuvième édition (1986)

Section n°4 : Bacille et cocci aérobies Gram négatif		
<u>Famille</u>	<u>Genre</u>	<u>Espèce</u>
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
		<i>fluorescens</i>
		<i>putida</i>
		<i>stutzeri</i>
		<i>syringae</i>
		<i>viridiflava</i>
		<i>cichorii</i>
		<i>mendocina</i>
		<i>alcaligens</i>
		<i>pseudoalcaligens</i>
Azotobacteriaceae	<i>Xanthomonas</i>	<i>mallei</i>
		<i>pseudomallei</i>
		<i>rhizophila</i>
		<i>axi</i>
		<i>malvarum</i>
		<i>populi</i>
		<i>citri</i>
		<i>phaseolicola</i>
		<i>oryzae</i>
		<i>malvacearum</i>
Rhizobiaceae	<i>Frateuria</i>	
Methylcoccaceae	<i>Zooglea</i>	
Halobactériaceae		
Acetobactériaceae		
Legionellaceae		
Neisseriaceae		

6 [Selon Berche et al (1988), *Pseudomonas aeruginosa* fût isolée en 1882 par Carle Gessard à partir de pus bleu d'infections cutanées post-chirurgicales.]

7 [Le groupe des bactéries du genre *Pseudomonas* a subi de nombreux remaniements taxonomiques avec la création de nouveaux genres tels que *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Flavimonas*, *Comamonas*.]

8 [La classification actuelle (Séquençage de l'ARN 16s) permet de classer *Pseudomonas aeruginosa* dans le groupe I d'ARN (Avril et al., 2000).]

Groupe I d'ARN

Groupe fluorescent → **Genre *Pseudomonas* stricto sensus**

<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.pseudoalcaligens</i>
<i>P.fluorescens</i>	<i>P.mendocina</i>
<i>P.putida</i>	<i>P.stutzeri</i>
<i>P.veronii sp nov.</i>	<i>P.balearica sp nov.</i>
<i>P.alcaligens</i>	<i>P. monteilii sp nov.</i>

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Le bacille pyocyanique (du grec puon : Pus et du latin cyaneus : bleu foncé) est maintenant désigné sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa* (Leminor et Veron, 1989).

1.4. Caractères cultureux

Selon l'espèce, la température optimale de croissance se situe entre 20°C et 40 °C, et permet de distinguer certaines espèces.

[L'odeur caractéristique des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* est due à la production d'ortho-amino-acétophénone, un intermédiaire du métabolisme du tryptophane.]

Ref

Pseudomonas aeruginosa apparaît sous différents aspects selon les milieux utilisés :

- Sur les milieux sélectifs : la capacité de croître sur le milieu lactosé de MacConkey constitue un critère d'identification, les *Pseudomonas* qui peuvent croître sur ce milieu y produisent des colonies lactose négatives incolores. En outre, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez les personnes qui souffrent de fibrose kystique, y produisent de grandes colonies muqueuses.
- Sur gélose au sang : après 24 heures d'incubation, *Pseudomonas aeruginosa* produit des colonies aplaties ou légèrement bombées de 2 à 4 mm de diamètre, la périphérie des grosses colonies est ondulée (Couture, 1990).

Le bacille pyocyanique produit un voile fragile et peu épais à la surface des milieux liquides. Le voile est visqueux (slime) et sa nature est controversée : polyside muqueux ou acide désoxyribonucléique libéré par la lyse d'une partie des cellules bactériennes (Leminor et Veron, 1989).

1.5. Caractères biochimiques

Le bacille pyocyanique possède toujours une cytochrome oxydase et peut se développer sur milieu sélectif au ceftrimide, il métabolise les sucres uniquement par voie oxydative, il produit une arginine dihydrolase, une gélatinase, ainsi qu'une nitrate réductase (Cavallo et al. 1997) (Tableau 2.)

Pseudomonas aeruginosa synthétise deux types de pigments.

1.5.1. Les pigments phénaziniques (non fluorescents)

Pseudomonas aeruginosa élabore un pigment bleu, la pyocyanine, qui peut jouer un rôle de transporteur d'électrons dans les conditions d'anaérobiose. Dans le cas où la chaîne cytochromique serait inhibée (par l'azide de sodium par exemple), la pyocyanine peut servir d'accepteur terminal d'électrons. Par ailleurs, elle possède une action bactériostatique sur diverses bactéries. Cette molécule est synthétisée lorsque le milieu est pauvre en fer, permettant ainsi à la bactérie de fixer les ions Fe^{3+} extracellulaire (Ki-young et Verstraete, 1993).

Tableau 2: Caractères d'identification des principales espèces de *Pseudomonas* (Leminor et Veron, 1989)

Caractères d'identification	Groupes Génomiques										
	Ia	Ib	Ic	Id	Ila	Ilb	III	IV	V	Nd	
	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i>	<i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. pertucinogena</i>	<i>P. pseudomallei</i> <i>P. mallei</i> <i>P. ceppacia</i>	<i>P. pekettii</i>	<i>P. acidovorans</i> <i>P. testosteroni</i>	<i>P. diminuta</i>	<i>X. maltophilia</i>	<i>P. paucimobilis</i>	
Nombre de flagelles	1 >1 >1	1 -	1 -	1 -	>1 0 >1	1	>1 >1	1 -	>1	1	
Réserve de poly-β-hydroxybutyrate	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	-	+ + +	+ +	-	-	
Croissance à 4°C	+ - -	d +	+ +	+ +	+ d d	-	d d	d -	-	-	
Croissance à 41°C	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	-	- - -	d +	+ -	-	
Auxotrophie	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	-	- - -	- - -	- - -	-	
Utilisation comme seule source de carbone et d'énergie											
Acétate	+ + +	+ +	+ +	Nd	+ + +	+ -	+ +	+ +	+ -	Nd	
Glucose	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	Nd	
Tréhalose	- + -	- - -	- - -	- - -	+ d	- - -	- - -	- - -	+ -	Nd	
Maltose	- - -	- - -	- - -	- - -	+ d	- - -	- - -	- - -	- - -	Nd	
Inositol	- + -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	d -	- - -	- - -	Nd	
Mannitol	+ + +	d -	- - -	- - -	+ + +	- - -	d -	- - -	- - -	Nd	
Arginine	+ + +	- +	+ +	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	Nd	
Réaction de l'oxydase	+ + +	+ +	+ +	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Respiration des nitrates	+ d -	+ +	- - -	- - -	+ d -	+ -	- - -	- - -	- - -	-	
Arginine dihydrolase	+ + +	- +	+ +	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Clivage des phénols (b)	Or Or Or	Or Or	- - -	- - -	Or Or Or	Or	Me Me	- - -	- - -	Nd	
Acidification oxydative du											
Glucose (c)	+ + +	+ +	(+)	(+)	+ + +	(+)	+ -	(d)	+ -	+ +	
Fructose	+ + +	+ +	(+)	-	+ + +	(+)	+ -	- - -	+ -	+ +	
Mannose	d + +	+ +	- - -	- - -	+ + +	(+)	- - -	- - -	+ -	+ +	
Lactose	- d d	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	- - -	d -	+ +	
Maltose	- d d	+ -	- - -	- - -	+ + +	- - -	- - -	(d)	+ -	+ +	
Mannitol	d + d	d -	- - -	- - -	+ d +	- - -	+ -	- - -	- - -	-	
Hydrolyse de :											
ONPG	d - -	- - -	- - -	Nd	- - -	d -	- - -	d -	+ -	+ +	
Esculine	- - -	- - -	- - -	Nd	d d d	- - -	- - -	- - -	+ -	+ +	
Malonate	+ d d	d d	- - -	- - -	Nd Nd +	+ -	- - -	- - -	+ -	-	
Lysine décarboxylase	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ -	- - -	- - -	+ -	-	
Phénylalanine- désaminase	- - -	d d	d d	+ -	- - -	d -	- - -	- - -	- - -	-	
Hydrolyse de macromolécules											
Amylase	- - -	+ -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ -	- - -	d -	
Gélatinase	d + -	- - -	- - -	- - -	+ d d	d -	- - -	d d	+ -	-	
Lécithinase	d + -	- - -	- - -	Nd	d d d	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Désoxyribonucléase	d - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	d -	+ -	-	
Production de pyocyanine	+ - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Production de pyoverdine	+ + +	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Hémolyse	d d -	- - -	d -	- - -	d d -	- - -	- - -	- - -	- - -	-	
Sensibilité à la polymyxine	+ d +	+ +	+ +	+ +	- - -	- - -	d d	d d	d d	d d	
Sensibilité à la furantoïne	- d -	d -	Nd d	Nd	Nd Nd -	d -	+ -	d -	- -	+ -	

(a) +, - : caractère présent ou absent chez plus de 80p.100 des souches ; d : résultat positif chez 20-80p.100 des souches ; Nd : non déterminé. Lecture des réactions après 48h d'incubation à 30°C (sauf indication contraire).
 (b) : clivage des diphenols (Stanier et coll.,1966) ; Or : clivage en « ortho » ; Me : clivage en « méta » ; - : absence de clivage.
 (c) + : acidification rapide en 24h ; (+) : acidification discrète, apparaissant souvent après 48h ou 72h
 (d) : idem pour une partie seulement des souches. Culture en milieu de Hugh et Lefson ou en MEVAG.

1.5.2. Pigments fluorescents

Désigné sous le nom de pyoverdine, ce pigment jaune-vert est soluble dans l'eau (Avril et al., 1992). Cette substance élaborée surtout par *Pseudomonas fluorescens* possède la propriété d'un sidérophore (Cornelis et al. 1989) de nature chimique cathécholates ou hydroxamates (Meyer et al. 1992).

Il existe une relation entre le taux de fer et l'infection (Weinberg, 1995) ; en effet un taux de fer élevé dans le sang favorise l'infection par la bactérie (Neiland 1981, Gherinot, 1994). De même, si la bactérie possède beaucoup de sidérophores, l'infection sera plus facile (Martinez et al. 1990). Ainsi, le corps se défend en diminuant le taux de fer dans les liquides extracellulaires (Weinberg, 1986) ou bien en augmentant la température (fièvre) inhibant la synthèse des sidérophores (Kiyoung et Verstraete, 1993).

Sur le plan médical, Les sidérophores sont utilisés pour diminuer la concentration élevée du fer dans le sang (Lankford, 1973).

1.6. Caractères antigéniques

1.6.1. Antigène thermostable

La spécificité de l'antigène O est supportée par plusieurs polysaccharides de haut poids moléculaire qui sont des chaînes latérales du lipopolysaccharide. La composition en sucre aminé est différente d'un sérotype à l'autre, chaque sérotype donne une image caractéristique par immunoélectrophorèse.

Les prévalences du groupe O varient selon les pays, les plus fréquemment observés en France par exemple sont les groupes 6 et 11.

Le groupage paraît stable pour une souche donnée, cependant des variations peuvent être observées après une mutation ou après une lysogénéisation : la modification peut alors rendre la souche polyagglutinable (Leminor et Veron, 1989).

1.6.2. Antigènes thermolabiles

Parmi les antigènes thermolabiles identifiés et purifiés chez *Pseudomonas aeruginosa*, on peut citer la porine F membranaire et diverses enzymes diffusibles comme les protéases, la phospholipase C et l'exotoxine A (Leminor et Veron, 1989).

A cause de la difficulté de préparation de sérum antiflagellaire et de la présence d'au moins 55 antigènes différents dont la majorité sont communs à toutes les souches quelque soit le séro groupe O, le typage H n'est pas largement adopté par les laboratoires dans l'utilisation de routine. De plus les pilis et les protéines cellulaires peuvent être agglutinés par les anticorps anti H (Pitt, 1988).

Un autre inconvénient du typage H chez *Pseudomonas aeruginosa* est la variation de phase : certaines espèces, notamment les bacilles à Gram négatif, ont la capacité d'altérer le phénotype de fabrication de flagelles d'un type antigénique à un autre type. Cette alternance permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ; cette variation de phase est due à la présence d'éléments inversibles de type transposon (Neidahrtd et al, 1998).

1.7. Ecologie et pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est l'exemple caractéristique d'une bactérie dite pathogène opportuniste, c'est à dire qu'elle ne détermine de maladies que dans un terrain débilite (par exemple sujet immunodéprimé) ou bien après une inoculation agressive. La pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* est due à la production de plusieurs facteurs de virulence intra et extracellulaires (Rumbaugh et al., 1999). Les métabolites qui sont le plus souvent en rapport avec la physiopathologie sont les protéases, les hémolysines, la phospholipase C, le glucopeptide et les toxines dont l'exotoxine A, l'exoenzyme S, la cytotoxine, l'entérotoxine et le facteur de perméabilité vasculaire.

Selon Berche et al (1988), les infections causées par *P. aeruginosa* sont multiples : les infections cutanées, digestives, oculaires, pulmonaires, des oreilles, du système nerveux et les surinfections de plaies

L'environnement hospitalier joue un rôle primordial dans l'infection endémique. Ainsi, un robinet d'eau peut être à l'origine d'une éruption de souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes (Bert et Lambert-Zechovsky, 1997 ; Ferroni et al., 1998).

Une des sources de contamination, qui était autrefois la plus fréquente et la plus dangereuse, car la plus inopinée, mais qui est maintenant soigneusement contrôlée, est représentée par des solutions d'antiseptiques souillées par du bacille pyocyanique. Il s'agit soit d'antiseptiques inactifs sur ce germe (la plupart des dérivés d'ammonium quaternaire par exemple), soit de mutants résistants aux antiseptiques habituellement actifs (Leminor et Veron, 1989).

Pseudomonas aeruginosa peut être transmis horizontalement entre les groupes de patients à travers les mains ou le personnel médical et para-médical, ou à partir d'une source environnementale commune (Kerr et al. 1995 ; Traube et al., 1998). Une source secondaire de contamination est le malade lui-même, à partir de plaies infectées, crachat, salive, urine, escarres... dans lesquels le bacille pyocyanique peut rester vivant plusieurs semaines.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* peuvent revêtir une allure épidémique ; en effet, il a été rapporté dans un service de pédiatrie une épidémie à bacille pyocyanique dont l'origine était des jouets de bain (Buttery et al., 1998).

Les services à haut risque, par rapport aux infections isolées, ou épidémiques sont les unités néonatales, les unités de soins intensifs pulmonaires, les unités de chirurgie cardiaque et les services d'urologie et d'ophtalmologie (Vignes et al., 1995 ; Astruc, 1997).

Selon les résultats du NNISS depuis 1990, cette espèce est responsable de 9% des infections nosocomiales tous sites et services confondus. Sa responsabilité est aussi impliquée dans 16% des infections pulmonaires nosocomiales, 11% des infections urinaires, 3% des septicémies et 8% des surinfections de plaies opératoires (Emori et Gaynes, 1993).

En Europe, une incidence assez voisine de celle observée aux Etats unis a été mentionnée pour 1990, bien que de grandes variations existent entre hôpitaux et services. Dans une autre étude de prévalence incluant plus de 10000 patients et 1410 services de soins intensifs répartis dans 17 pays européens, *P.aeruginosa* tient en 1992 une place importante dans les infections respiratoires (20.8%), urinaires (11.3%) et celle du site opératoire (9.5%). Ainsi la mortalité des infections à *Pseudomonas aeruginosa* est encore de plus de 20% dans les infections méningées, 50% lors des septicémies ou encore de plus de 50.7% dans les pneumopathies (Spencer, 1996 ; Jarlier et al., 1995).

1.8. Les marqueurs épidémiologiques

La virulence de *Pseudomonas aeruginosa* rend nécessaire une parfaite connaissance des mécanismes de transmission et des risques d'infection, dans le but premier d'éviter leur éventuel allure épidémique. La prévention d'infection et le contrôle de *Pseudomonas aeruginosa* sont d'une extrême importance dans l'environnement hospitalier. L'efficacité de chaque mesure dépend de la disponibilité d'études épidémiologiques appropriées. Pour cette fin, de nombreux systèmes de typage pour la discrimination entre lignées sont utilisés :

- Des méthodes phénotypiques telles que la biotypie, l'antibiotypie, la sérotypie, la bactériocinotypie, la lyzotypie et la zymotypie. Ces techniques peuvent être utiles surtout en associant deux ou plusieurs d'entre elles (Cavallo, 1997).
- Des méthodes génotypiques tels que la ribotypie, le polymorphisme chromosomique (électrophorèse en champ pulsé et RAPD) et le profil plasmidique (Delsal et al., 1988 ; Passarge, 1995 ; Bingen et al., 1996 ; Salauze et al., 1997 ; Shreve et al., 1997 ; Chetoul et al., 1997)

LES
ANTIBIOTIQUES

II- LES ANTIBIOTIQUES

Une voie d'accès au traitement des maladies infectieuses est l'antagonisme de croissance entre deux microorganismes, cette action a été appelée "antibiose" par Villemin en 1889. la première observation de ce phénomène rapportée dans la littérature est due à Bartolomeo Bizio, qui observa en 1823 l'inhibition de la croissance de *Serratia marcescens* par des moisissures.

II. 1. Définition

Un antibiotique est un métabolite, produit par des microorganismes, possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenues par hémisynthèse (Bryskier, 1999). Les antibiotiques sont caractérisés par une activité anti-microbienne à l'échelle moléculaire sur des sites spécifiques, au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques ou de l'équilibre physico-chimique. Chaque antibiotique est caractérisé par son spectre qui correspond à l'étendue de son activité antibactérienne (Bryskier, 1999).

II.2. Classification et mode d'action des antibiotiques

Les agents antibactériens peuvent être classés selon leur structure chimique ou leur mode d'action sur les bactéries. Les molécules qui présentent une structure chimique de base identique sont regroupées dans une même famille, certaines ne comportant parfois qu'un ou deux représentants. Ce premier mode de classification permet ainsi d'individualiser 15 familles distinctes : les β - lactamines, les glycopeptides, la fosfomycine, les aminosides, les phénicolés, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, l'acide fusidique, les sulfamides, les quinolones, les rifamycines, les nitro-imidazolés, les nitrofuranes et les polymixines. En général, une même structure chimique confère aux antibiotiques un même mode d'action sur les bactéries (Hellali, 1999).

Les antibiotiques peuvent agir soit sur la structure bactérienne, soit sur une fonction métabolique spécifique. Leur cible peut être unique ou multiple, telle que la vanomycine qui agit sur la paroi, la membrane plasmique et l'acide nucléique (Bryskier, 1999). Schématiquement, l'action antibactérienne des antibiotiques s'effectue selon cinq principaux mécanismes (figure 1) (Hellali, 1999) :

- ❖ Interférence avec le métabolisme de la bactérie
- ❖ Action sur la paroi bactérienne
- ❖ Action sur la structure de la membrane plasmique
- ❖ Action sur la synthèse protéique
- ❖ Action sur les acides nucléiques

II.3. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

II.3.1. LES TYPES DE RESISTANCE

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise et ce, selon son déterminisme génétique.

II.3.1.1. RESISTANCE NATURELLE

C'est une résistance intrinsèque c'est à dire propre à toutes les souches d'une même espèce bactérienne. Le déterminisme génétique de cette résistance est d'origine exclusivement chromosomique. On parle alors, de caractère sauvage ou normal de l'espèce vis-à-vis de l'antibiotique. Cette résistance est stable, héréditaire mais non transférable (Cambau, 1996 ; Jarlier, 1997).

II.3.1.2. RESISTANCE ACQUISE

C'est une caractéristique propre à certaines souches d'une espèce naturellement sensible à l'antibiotique. Elle se manifeste sous l'effet d'une pression de sélection et résulte soit de mutation, soit le plus souvent d'un apport de nouveaux gènes, notamment par le biais de plasmides, phages, transposons. (Philippon, 1988; Cambau, 1996).

II.3.2. MECANISMES DE RESISTANCE

La résistance de certaines espèces bactériennes à certains antibiotiques peut être liée à plusieurs mécanismes de résistance, notamment :

II.3.2.1. L'inactivation de l'antibiotique par la synthèse d'enzymes bactériennes

Les bactéries produisent des enzymes qui altèrent chimiquement les antibiotiques et les rendent ainsi inactifs ; c'est le cas des β -lactamases hydrolysant l'anneau β -lactame des pénicillines et céphalosporines (Jacoby, 1994).

D'autres enzymes inactivent des molécules d'antibiotiques en y ajoutant des groupements chimiques ; c'est le cas des aminosides qui peuvent être inactivés par phosphorylation, adénylation ou acétylation (Shaw et al, 1993)

II.3.2.2. Diminution de la perméabilité

La diminution de la perméabilité d'une bactérie à un antibiotique correspond à l'inhibition de la pénétration de cet antibiotique dans la bactérie. L'absence de perméabilité est un phénomène de résistance naturel chez certaines espèces mais, qui peut survenir chez des espèces sensibles à la suite d'une mutation chromosomique.

Ce mécanisme n'affecte pas les bactéries à Gram positif car les antibiotiques diffusent librement à travers le peptidoglycane qui constitue la paroi de ces bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif, au contraire, la barrière constituée par le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe s'oppose à la pénétration des antibiotiques. Cependant, cette membrane est traversée par des protéines trimères, les porines, qui forment des canaux permettant le passage de molécules hydrophiles comme les pénicillines à large spectre, les céphalosporines, les aminosides, les phénicolés ou les tétracyclines (Nikaido, 1992 ; Sutherland, 1993).

Des mutations entraînant des modifications quantitatives ou qualitatives de ces porines sont responsables de résistances acquises souvent croisées à plusieurs familles d'antibiotiques. Elles sont constatées chez les entérobactéries, *Pseudomonas*, *Haemophilus* et les Gonocoques, mais n'occasionnent pas toujours de résistances perçues cliniquement (Nikaido et al, 1992).

II.3.2.3. Modification du site d'action ou cible

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut qu'il se fixe à une cible dans la bactérie. Si cette cible est modifiée de telle manière que l'antibiotique ne puisse plus s'y fixer, la bactérie acquiert une résistance qui s'étend souvent à toute une famille d'antibiotiques.

- **Exemple 1 : Modification des PLP**

La modification des protéines de liaison à la pénicilline ou PLP (protéines enzymatiques constituant la cible des β -lactamines) est surtout observée chez les Staphylocoques, les Entérocoques et les Pneumocoques. Elle est due à une diminution d'affinité des PLP, soit par augmentation de leur production, soit par synthèse de nouvelles PLP de très faible affinité (Grossato et al, 1991 ; Sutherland, 1993).

- **Exemple 2 : Modification de la cible ribosomale**

Les ribosomes, lieu des synthèses protéiques, peuvent être altérés dans leur structure et leur fonctionnement par la fixation d'un antibiotique.

Une modification de la cible ribosomale acquise par mutation diminue l'affinité du site de fixation de l'antibiotique et rend la bactérie résistante. Ce mécanisme est responsable des résistances aux tétracyclines, aux macrolides et lincosamides, aux phénicolés et plus rarement aux aminosides (Roy, 1997).

- D'autres exemples de cibles modifiées sont également connues. C'est le cas des enzymes intervenant dans la synthèse des acides nucléiques qui, modifiées, deviennent insensibles aux quinolones (ADN gyrase), rifamycines (ARN polymérase), sulfamides (DHPS, enzyme intervenant dans la synthèse des purines) et triméthoprim (DHFR, enzyme intervenant dans la synthèse des pyrimidines) (Roy, 1997).

II.3.2.4. Substitution de la cible

Les sulfamides et le triméthoprim inhibent les enzymes nécessaires à la synthèse de l'acide folique qui est indispensable à la synthèse des acides nucléiques. Un des mécanismes de résistance observés avec ces antibiotiques suppose, entre autres, le développement d'une voie métabolique visant à remplacer la voie bloquée par l'antibiotique. En effet, certaines bactéries codent une autre enzyme insensible à l'agent antibactérien grâce à un plasmide de résistance. Ces bactéries produisent ainsi une enzyme chromosomique sensible et une enzyme plasmidique insensible (Roy, 1997).

II.3.2.5. Expulsion des antibiotiques

Les bactéries produisent souvent des protéines membranaires agissant comme pompes moléculaires permettant d'expulser un antibiotique à l'extérieur de la cellule. C'est le mécanisme principal de la résistance à la tétracycline, chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il existe aussi de telles pompes spécifiques de la résistance au chloramphénicol chez les bactéries à Gram négatif et de la résistance aux quinolones chez les Staphylocoques. D'autres pompes, ayant moins de spécificité de substrat ont été également mises en évidence chez *E. coli*, elles sont capables de transporter des antibiotiques variés (Nikaido, 1994).

II.3.3. DISSEMINATION DE LA RESISTANCE

Les gènes de résistance aux antibiotiques ne semblent pas apparus de novo depuis l'ère des antibiotiques. Ils proviennent plutôt de bactéries productrices d'antibiotiques. Ces gènes qui ont évolué depuis des millions d'années étaient prêts à être recrutés par des éléments génétiques mobiles et à être transférés chez des organismes ayant maintenant besoin des gènes de résistance pour survivre. En effet, en plus des plasmides et des transposons, les bactéries ont même développé des moyens naturels de dissémination de la résistance (intégrons) ressemblant étrangement aux méthodes de génie génétique développées au laboratoire (Davies, 1994 ; Roy, 1997).

II.3.3.1. PLASMIDES

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être transmis d'une espèce à l'autre par le biais de plasmides, éléments d'ADN extra-chromosomique capables de se répliquer indépendamment du chromosome. La plupart des plasmides d'importance clinique sont conjugatifs, ils possèdent les gènes pour les pilis sexuels et pour un mécanisme spécialisé de réplication de l'ADN. Les gènes de résistance peuvent s'associer aux plasmides, soit par le système de recombinaison homologue de la cellule, soit encore par les mécanismes spécialisés tels que les transposons et les intégrons. Une fois le gène de résistance est présent sur le plasmide, il peut être transmis à toutes les espèces faisant partie de la gamme des cellules hôtes du plasmide (Roy, 1997).

II.3.3.2. TRANSPOSONS

Les transposons sont des éléments mobiles d'ADN (gènes sauteurs) capables de se transférer entre un chromosome et un plasmide ou encore entre deux plasmides. Ces éléments qui codent pour la résistance aux antibiotiques sont responsables de la dissémination de cette résistance ; c'est le cas du transposon Tn 3 portant les gènes de β - lactamases à spectre élargi et responsable de la dissémination de la résistance aux céphalosporines de troisième génération (Roy, 1997).

II.3.3.3. INTEGRONS

Les intégrons constituent une nouvelle famille d'éléments génétiques dans lesquels de multiples gènes cassettes codant chacun pour une résistance à un antibiotique peuvent s'insérer sous forme de séquences mobiles par recombinaison « site – spécifique » à l'aide d'une intégrase similaire à celle du bactériophage lysogène λ (Roy et al, 1997).

La structure des intégrons comprend deux régions conservées flanquant une région variable où se trouvent les gènes cassettes intégrés. La région 5' conservée comprend le gène *int* codeur de l'intégrase, le site d'intégration des cassettes et le promoteur responsable de l'expression des gènes cassettes. La région conservée 3' contient des gènes de résistance pour d'autres antibactériens (Figure 2) (Poirel et al, 1999).

Les intégrons constituent donc une sorte de génie génétique naturel et forment des opérons de résistance fortement exprimés. Ils font parfois partie de divers transposons et se retrouvent aussi dans des plasmides de plusieurs groupes d'incompatibilité. Parmi les gènes de résistance cliniquement importants portés par les intégrons, on retrouve les gènes conférant la résistance aux aminosides ainsi que les gènes de β - lactamases de type OXA et CARB et plusieurs gènes responsables de la résistance au triméthoprime (Roy, 1997 ; Poirel al, 1999).

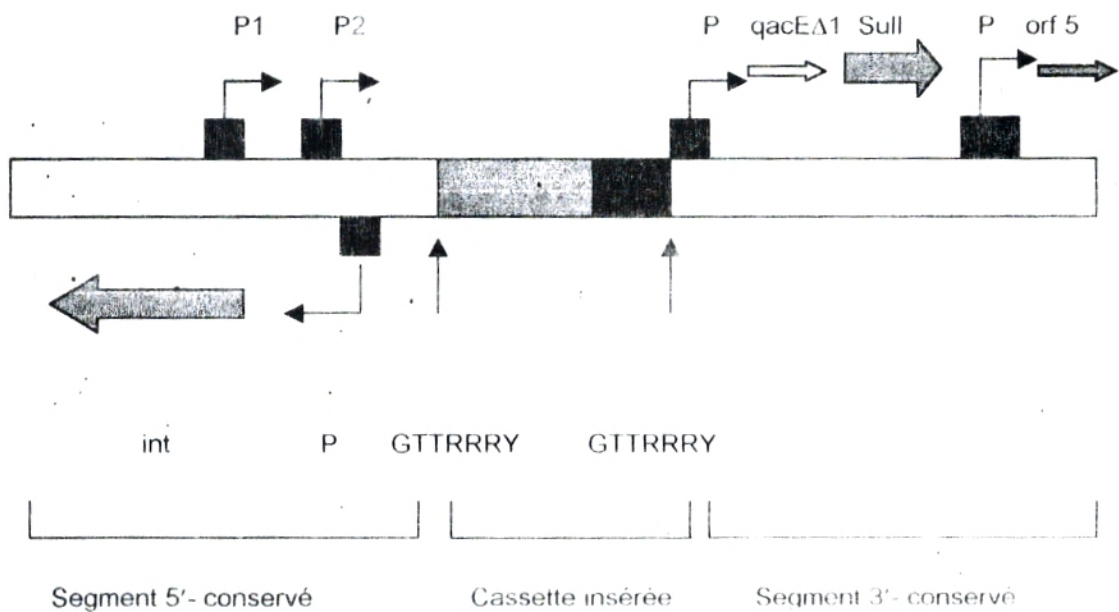


Figure 2 : Structure générale des intégrons (ROY, 1997).

Les flèches indiquent la direction de la transcription. L'emplacement et l'orientation des promoteurs sont indiqués. Les séquences GTTRRRY indiquent les points des crossing-over pour l'intégration spécifique de site des cassettes. On indique ici une cassette insérée avec sa séquence palindromique en aval ; il peut y avoir plusieurs cassettes intégrées en tandem. *qacEΔ1* : résistance aux composés aminés quaternaires (faible, gène tronqué), *Sul 1* : résistance aux sulfamides.

LES
BETA-LACTAMINES

III- LES BETA-LACTAMINES

III.1. HISTORIQUE

En **septembre 1928**, **Fleming** fit l'observation qu'un contaminant banal de laboratoire avait une action inhibitrice très marquée sur la croissance de *Staphylocoques* cultivés à son côté. Le champignon fût identifié par la suite comme appartenant à l'espèce *Penicillium notatum*; de même la substance produite fût appelée **Pénicilline**.

Depuis, l'ère des antibiotiques a véritablement évolué et l'industrie pharmaceutique s'est alors mise à développer de nouvelles classes de β -lactamines tel que les céphamycines, les oxy-imino-céphalosporines, les carbapénèmes, les monolactames, les clavames et les inhibiteurs de bêta-lactamases.

III.2. Structure et classification des bêta-lactamines

La famille des β -lactamines se compose de quatre groupes de molécules : les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monolactames. On doit ajouter à cela les inhibiteurs de β -lactamases dont certaines structures sont incluses dans les quatre principaux groupes, (Bryskier, 1999).

La structure de base des β -lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame, laquelle est indispensable pour l'activité des molécules. Sur cette structure est fixé un cycle penta-atomique saturé (Pénam), insaturé (Pénem) ou hexa-atomique (Céphèmes) (Figure 3). le noyau azétidone seul (β -lactamine monocyclique) peut être substitué, et en fonction des substituants de l'atome de l'azote, il est possible de distinguer les monobactames (Aztréonam), les monocarbames, les monophosphatames. Actuellement, du fait de la complexité de ce groupe, il est dénommé monolactame. (Bryskier, 1999)

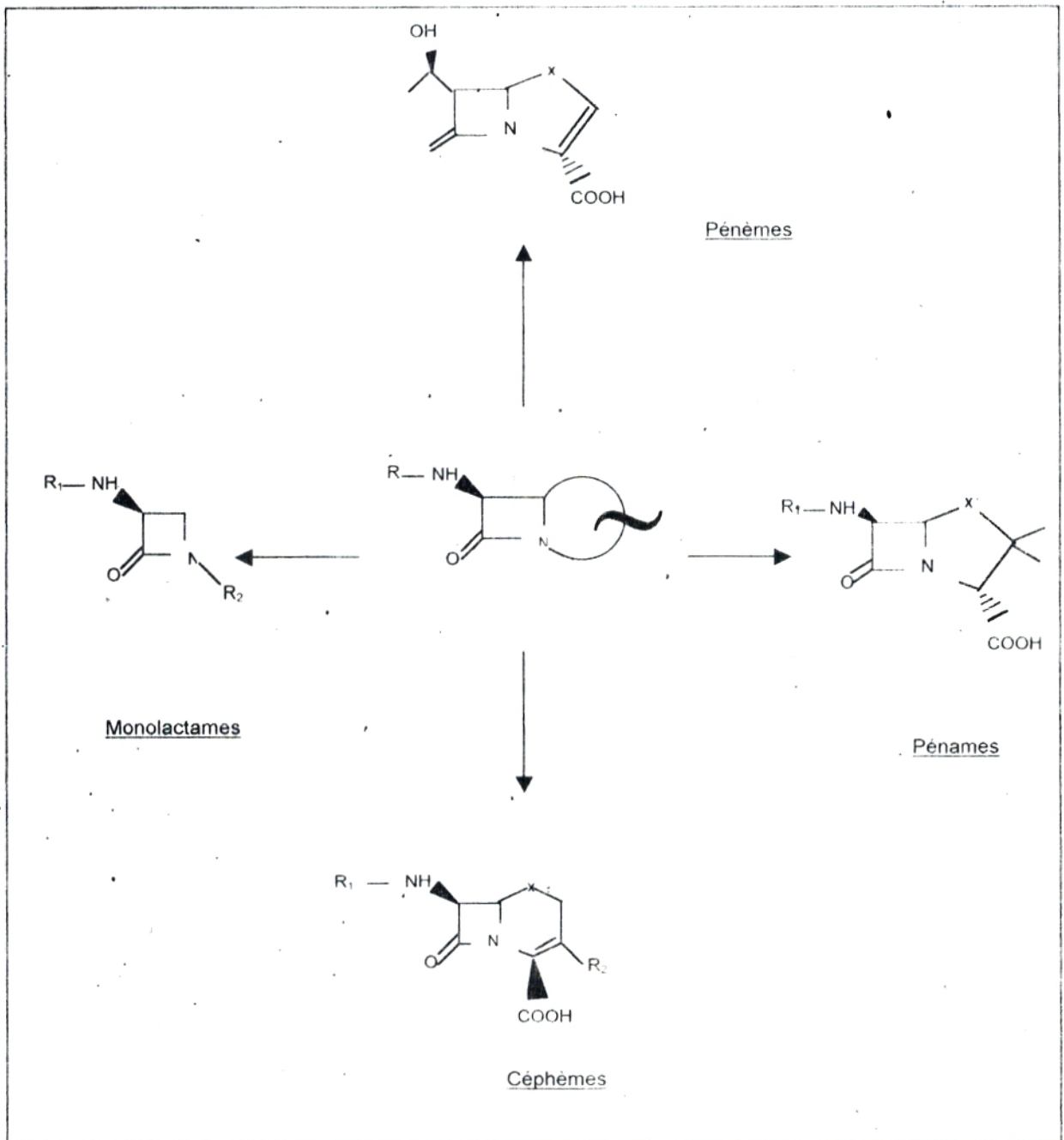


Figure. 3 : Classification des β -lactamines (Bryskier, 1999)

III. 2.1. Pénames

Ce groupe comprend les pénicillines, les oxa-1 pénams et les carbapénams.

III. 2.1.1. Les pénicillines

Les pénicillines sont constituées de trois parties : un noyau thiazolidine fixé sur un cycle β -lactame et une chaîne latérale en C_6 qui permet de les différencier. On distingue les groupes suivants : les pénicillines G, les pénicillines M, les pénicillines A, les pénicillines 6α substituées, les α carboxy et α sulfoxy pénicillines, les amidino-penicillines, les oxymino-penicillines. (Figure 4)

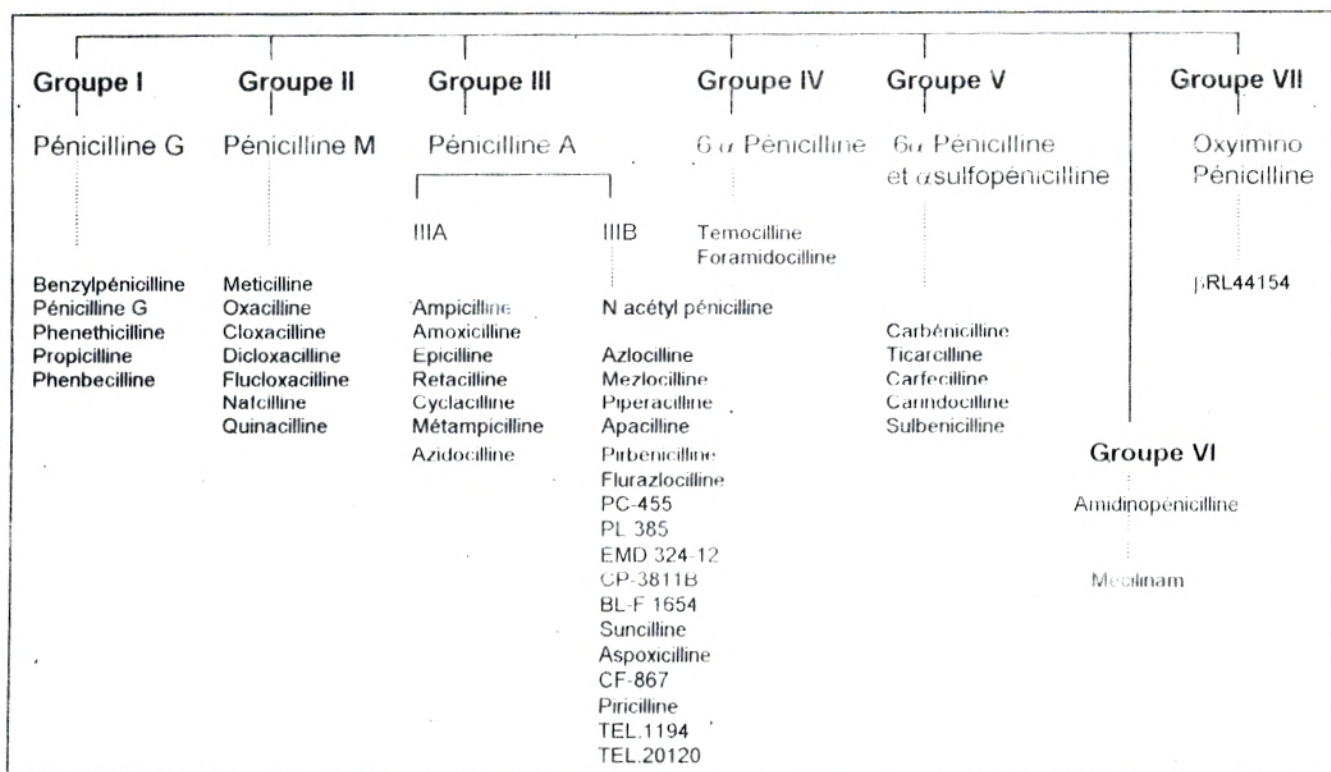


Figure. 4 : Classification des pénams (Bryskier, 1999)

III. 2.2. Les céphèmes

Les céphèmes se caractérisent par un cycle azétidone auquel est accolé un hexacycle insaturé. Sur ces deux cycles sont fixées des chaînes latérales. Selon la nature du noyau, il est possible de distinguer cinq classes de céphèmes : les céphalosporines, les céphamycines, les céphabacines, les oxa-1 céphèmes, les carba 1- céphèmes et divers.

Les céphèmes sont également communément classés par génération (Bryskier, 1999) ; en effet, on distingue :

- **Les céphalosporines de première génération**

Elles sont stables à l'action des pénicillinases des Staphylocoques et certains cocci à Gram négatif. Cependant, elles sont dégradées par les céphalosporinases de certains bacilles à Gram négatif. Ce groupe comprend : la céfalotine, la céfazoline, la céfapirine, la céfradine, la céfacétrile, la céfaléxine, le céfadroxil et le céfaclor.

- **Les céphalosporines de deuxième et de troisième génération**

Elles ont une meilleure activité sur les bacilles à Gram négatif. Dans la deuxième génération, on trouve le céfamandole, le céfuroxime, la céfoxitine et le céfotetan. La troisième génération comprend le céfotaxime, le céfménoxime, le céftizoxime, le céftriaxone, le céfopérazone, la céftazidime, le céftiam, la céfsulodine et le latamoxef.

- **Les céphalosporines de quatrième génération**

Elles sont caractérisées par une activité 2 à 4 fois plus importante que les autres céphalosporines vis-à-vis des entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinases, ainsi que par leur stabilité aux β -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les aminothiazolyl-céphalosporines. C'est le cas du céfepime et du céfpirome.

III.3. Peptidoglycane et mode d'action des bêta-lactamines

III.3.1. Biosynthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel des bactéries à Gram positif comme à Gram négatif et spécifique du monde bactérien, la synthèse peut être schématisée en trois étapes successives :

La première aboutit à la formation de deux unités de base, l'UDP-N- acétyl glucosamine et l'UDP-N- acétyl muramyl pentapeptide et se passe à l'intérieur de la bactérie.

La deuxième permet le passage par un système de transporteur lipidique à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former un disaccharide pentapeptide.

Enfin, ce disaccharide pentapeptide s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade deux enzymes essentielles interviennent ; d'une part une transglycosylase permet l'attachement des disaccharides pentapeptides entre eux aboutissant à la formation de chaînes polysaccharidiques ; d'autre part, une transpeptidase réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine, tandis que l'alanine-5 est libérée.

D'autres enzymes interviennent également : carboxypeptidase, endopeptidase. Chacune de ces étapes peut être perturbée par des antibiotiques : la fosfomycine et la cyclosérine inhibent la synthèse des glycopentapeptides précurseurs, la bacitracine le transfert transmembranaire, tandis que la vancomycine et les β -lactamines inhibent les réactions terminales de la synthèse. (Duval, 1989).

La première phase est le transfert par une enzyme de 360 résidus du pentapeptide précédent à un transporteur lipidique, qui est le phosphate de l'undécaprénol. Ce transfert est accompagné par l'élimination d'une unité uridyl monophosphate (U.M.P.). le produit obtenu est l'undécaprényl diphosphate-N-acétyl muramique pentapeptide.

Une molécule d'UDP-N-acétyl glucosamine se fixe ensuite au produit précédent avec l'élimination d'UDP, le « module » ainsi obtenu : l'undécaprényl diphosphate N acétyl muramique pentapeptide, N-acétyl glucosamine est incorporé dans le peptidoglycane. Tout d'abord par une transglycosylation, ce qui élimine le transporteur lipidique undécaprényl pyrophosphate, une fois la liaison osidique formée, les réactions concernant la partie protéique peuvent commencer. L'ensemble des réactions est catalysé par les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) qui sont situées à la face externe de la membrane cytoplasmique, à laquelle elle sont attachées et orientées vers le périplasme.

Ces dernières étapes sont inhibées par les antibiotiques de la famille des β -lactamines qui bloquent l'action des PLP (Labia, 1999).

III.3.2. Mode d'action des β -lactamines

Au cours de la division cellulaire, une acétylmuramidase produit d'abord la lyse partielle de la paroi de la cellule mère, puis une transpeptidase intervient pour synthétiser la paroi des cellules filles. Les β -lactamines bloquent la transpeptidase, provoquent la formation d'une paroi incomplète, aboutissant à l'éclatement de la bactérie. Ce mode d'action explique le spectre étroit de ces antibiotiques : en effet, seuls les cocci à Gram positif possèdent 60% de leur paroi cellulaire constituée de mucopeptides, alors que les bacilles à Gram négatif ont une paroi formée de 10% seulement de mucopeptides . (Hellali, 1999).

III.4. Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

III.4.1. Résistance naturelle

On évoque la résistance naturelle lorsqu'une forte proportion des bactéries d'une espèce donnée, ont manifesté d'emblée un phénomène de résistance avant toute pression de sélection (Labia, 1999).

Pseudomonas aeruginosa est une des espèces les plus résistantes. Ampicilline, céphalosporines de première et deuxième génération, sont régulièrement inefficaces. Cette résistance naturelle résulte de la combinaison de trois mécanismes : (Duval et Soussy, 1990)

III.4.1.1. Perméabilité membranaire

Une faible perméabilité membranaire est due principalement à sa nature hydrophobe qui constitue une barrière efficace contre des molécules hydrophiles tels que les β -lactamines. Les canaux protéiques ou porines qui autorisent leur passage sont trop étroits pour permettre une diffusion rapide (Bert et Lambert-Zechovsky, 1999).

Nakae (1991) a étudié la perméabilité de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* en examinant la pénétration dans l'espace périplasmique des saccharides radioactives dont la taille moléculaire diffère. Il a conclu que seules les molécules de faible poids moléculaire sont aptes à pénétrer. D'autre part, la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* est 100 à 400 fois moins perméable que celle d'*Escherichia coli*; cette faible perméabilité a été interprétée par la présence d'un nombre insignifiant de pores ayant une grande taille ou l'existence exclusive de petits pores.

III.4.1.2. Résistance par production d'une céphalosporinase chromosomique

L'existence d'une β -lactamase chromosomique de type amp-C (céphalosporinase) identifiée depuis les années 1970, permet à cette espèce de s'adapter plus ou moins rapidement aux conditions environnementales, d'où la sélection de variant résistant aux β -lactamines devenus hyperproducteurs de la β -lactamase chromosomique (Philippon, 1998).

Cette céphalosporinase est inductible, ainsi les molécules qui sont à la fois inductrices de cette enzyme et instables vis-à-vis de son action (aminopénicilline, céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} génération, céfotaxime, céftriaxone) sont constamment inefficaces. Les composés naturellement actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* correspondent à des molécules faiblement inductrices de la céphalosporinase (Pipéracilline, Céftazidime) ou fortement inductrices mais stables vis-à-vis de cette enzyme (Bert et Lambert-Zechovsky, 1999)

III.4.1.3. Résistance par systèmes d'efflux actifs

III.4.2. Résistance acquise

III.4.2.1. Perméabilité membranaire

Il a été mis en évidence que la résistance du bacille pyocyanique aux carbapénèmes est due principalement à la perte de la porine OprD. (Watanabe et al., 1991 ; Dib et al., 1992 ; Ochs et al., 1999).

De même, une étude faite sur la membrane externe de mutants résistants aux β -lactamines (Latamoxef) a révélé un manque en protéine C.D2.E1. (Yamano et al., 1990)

L'imipénème et le méropénème, le biampénème et Bo-2727 contiennent des groupement basiques chargés positivement en position 2 qui permettent aux molécules de pénétrer dans la paroi de *Pseudomonas aeruginosa* par le canal de protéine OprD, laquelle accepte des molécules de 350 à 400 Dalton, BMS 1139 ne possède qu'une résistance croisée partielle avec l'imipénème et le méropénème car elle n'empreinte pas la voie de OprD. les acides amines qui utilisent cette voie inhibent la pénétration de l'imipénème, du panipénème mais pas celle de BMS 181139 (Bryskier, 1999)

Par ailleurs, les modifications de composition du LPS sont encore mal connues, de même que les conséquences en termes d'augmentation de résistance des différents antibiotiques (Philippon, 1998). Certaines modifications qualitatives et quantitatives au niveau du LPS de la bactérie peuvent occasionner une baisse de perméabilité membranaire d'où une résistance accrue à l'ensemble des β lactamines à l'exception de l'imipénème.

III.4.2.2. Résistance par modification de la cible (PLP ou PBP modifiées)

L'implication de ce mécanisme chez *Pseudomonas aeruginosa* est une réalité limitée, bien que démontrée aussi bien expérimentalement que lors d'isolement de souches cliniques chez les malades. L'expression de la résistance varie selon la protéine liant la pénicilline (PLP) impliquée. Néanmoins l'augmentation des CMI des β -lactamines telles que la ticarcilline, céf sulodine, céftazidime, aztréonam est limitée, et est en fait plus marquée pour une molécule, en raison de son affinité élective pour la PLP impliquée (Philippon, 1998).

Trois mécanismes distincts semblent être à l'origine de cette résistance :

- Une modification de la structure d'une PLP sensible entraînant une réduction de son affinité vis-à-vis de l'antibiotique. (Ghuysen et al, 1986 ; Neu, 1992)
- Une hyperproduction de la PLP qui normalement est présente en quantité infime dans la souche sensible. (Berche et al, 1988 ; Frère et al, 1991)
- L'acquisition d'un gène complet ou fragment de gène codant pour une PLP plus résistante (Cole et Nicolas, 1986)

Ainsi la résistance croisée de *Pseudomonas aeruginosa* à la céf sulodine et la carbénicilline peut être attribuable uniquement à l'affinité réduite de PLP₃, une protéine essentielle pour la division cellulaire (Gotoh et al, 1990).

III. 4.2.3. Résistance par systèmes d'efflux actifs

L'efflux de drogues ou le pompage unidirectionnel de ces molécules cytotoxiques est un mécanisme important dans la résistance aux antibiotiques. Bien que ces systèmes soient habituellement codés par le chromosome, certains sont présents sur des plasmides.

Ce type de transport, médié par des protéines, est effectué par un mécanisme uniport couplé à l'hydrolyse de l'ATP ou plus communément par un mécanisme antiport dans lequel le système d'efflux est relié aux afflux des protons générés par la force proton motrice (PMF) (Piddock et al, 1997).

Dans certains cas la résistance naturelle aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* s'effectue par le même mécanisme d'excrétion de la pyoverdine lors du transport de fer (Jarlier, 1997).

Le bacille pyocyanique possède trois systèmes d'efflux différents ayant une structure similaire composée chacun de:

- Une protéine membranaire cytoplasmique qui agit comme une pompe à protons : Mex B.
- Une protéine de liaison placée dans le cytoplasme : Mex A.
- Une protéine logée dans la membrane externe qui fait office de pore OPrM

Les gènes de structure font partie d'opéron et sont placés dans le même ordre : protéine de liaison, protéine d'efflux et porine (Figure 7).

Ces déterminants génétiques sont situés en des lieux distincts du chromosome ; des homologies entre les protéines des trois systèmes suggèrent une origine commune. Chaque opéron d'efflux est précédé d'un gène régulateur. Dans les systèmes Mex AB OPrM et Mex CD OprJ ; le régulateur est un répresseur Mex R et nfx B respectivement. Tandis que le régulateur nfx C du système Mex EF OprN est un activateur (Pecher et al, 1998).

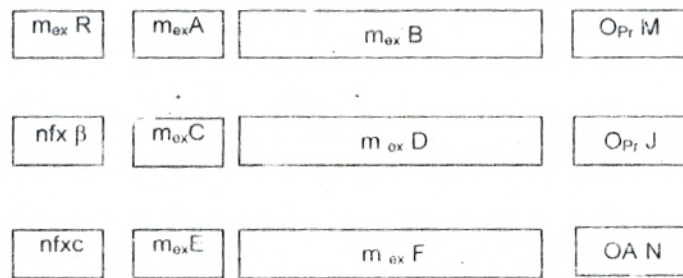


Figure 7 : Déterminants génétiques des systèmes d'efflux polyvalents de *Pseudomonas aeruginosa* (Pecher et al, 1998)

La fonction naturelle de l'opéron $m_{ex}AB-O_{Pr}M$ est de permettre l'exportation de la pyoverdine et de ces produits de dégradation. Cependant, il s'agit d'un système de transport non spécifique. L'expression de cet opéron est sous la dépendance du gène régulateur $m_{ex}R$. Une mutation au niveau de ce gène ($arg\ 60 \rightarrow trp$) entraîne une activation de l'opéron et une hyper production de la protéine $O_{Pr}M$. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il existe au moins un autre système d'efflux. Une mutation au niveau du gène régulateur $nfxB$ donne des mutants qui demeurent sensibles au méropénème et qui hyperproduisent une protéine pariétale $O_{Pr}J$. Chez ces mutants, l'accumulation intra-bactérienne de la norfloxacine est très diminuée. Les mutants $nfxC$ sont résistants aux fluoroquinolones, à l'imipénème et au chloramphénicol mais deviennent hypersensibles aux autres β -lactamines et aux aminoglycosides. Ils possèdent une quantité moindre de $O_{Pr}D$ et une augmentation de $O_{Pr}N$ (Bryskier, 1999). Les trois systèmes présentent des spécificités croisées pour les substrats qu'ils peuvent effluer (Tableau 3)

Tableau 3 : Systèmes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*. (Pidcock et al., 1997)

Locus	Transporteur	Protéine de fusion membranaire	Canal de membrane externe	Substrats
Mex AB-Opr M	Mex B	Mex A	Opr M	Tétracycline, Chloramphénicol Fluoroquinolones, Novobiocine, Erythromycine, β -Lactamines, Rifampicine, Acide Fusidique, Ethidium, Acrédine, Cristal violet, Déoxycholate, Sodium dodecyl sulfate
Mex CD-Opr J	Mex D	Mex C	Opr J	Tétracycline, Chloramphénicol, Fluoroquinolones, β -lactamines (exception des carbapénèmes), Novobiocine, Erythromycine, Acide fusidique, Rifampicine.
Mex EF-Opr N	Mex F	Mex E	Opr N	Chloramphénicol, Fluoroquinolones, Carbapénèmes.

III. 4.2.4. Résistance enzymatique

Les β -lactamases hydrolysent la liaison carbonyle β -lactamines rendant ainsi l'antibiotique inactif. (Bryskier, 1999)

III.4.2.4.1. Acquisition de pénicillines

De nombreuses bêta-lactamases, codées par des gènes situés sur des plasmides, ont été décrites chez *P. aeruginosa*. Elles sont classiquement classées en 3 groupes principaux en fonction de leur profil de substrat :

- Le groupe PSE ou CARB (carbénicillines) comportant PSE-1, PSE-2, PSE-3 et PSE-4,
- Le groupe OXA (oxacillines) constitué d'une série d'enzymes (OXA-1 à OXA-10),
- Le groupe TEM qui comporte les variants TEM-1 et TEM-2

Ces enzymes confèrent une résistance à la ticarcilline, la pipéracilline et certaines céphalosporines, mais épargnent la céftazidime, l'aztréonam et les carbapénèmes. Les inhibiteurs de bêta-lactamases permettent de restaurer partiellement l'activité des bêta-lactamines associées mais leur efficacité est globalement décevante puisque cette restauration est insuffisante contre la plupart des souches produisant une PSE-1 ou une OXA. (Bert et Lambert-Zechovsky, 1999)

III.4.2.4.2. Les bêta-lactamases à spectre étendu

Les bêta-lactamases à spectre étendu sont des enzymes plasmidiques largement répandues chez les entérobactéries des genres *Klebsiella* et *Enterobacter*, conférant une résistance aux céphalosporines de troisième génération et sensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases. Chez *P.aeruginosa*, une telle enzyme a été détectée pour la première fois chez une souche isolée d'un patient originaire de Turquie grâce à une synergie observée entre la céftazidime et l'acide clavulanique et elle a été désignée PER-1. Depuis, d'autres bêta-lactamases à spectre étendu, ayant évolué par mutation à partir de pénicillinases, ont été décrites chez cette espèce : certaines dérivent d'oxacillinase (OXA-11, OXA-14, OXA-15...) et d'autres de TEM (TEM-42). Elles confèrent une résistance à l'ensemble des bêta-lactamases à l'exception des carbapénèmes. (Bert et Lambert - Zechovsky, 1999)

III.4.2.4.3. Les métallo-bêta-lactamases (imipénémases)

La résistance à l'imipénème par production de bêta-lactamase chez *P.aeruginosa* a été décrite pour la première fois au Japon en 1991. Cette bêta-lactamase de type métallo-enzyme, désignée IMP-1, a été ultérieurement identifiée chez d'autres souches de *P.aeruginosa* dans ce pays. Ces souches sont résistantes aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et aux carbapénèmes, mais demeurent sensibles à la pipéracilline et à l'aztréonam. L'activité de l'imipénème n'est le plus souvent que modérément affectée (CMI=8mg/l), et un haut niveau de résistance n'est observé qu'en cas d'association à un mécanisme d'imperméabilité. (Bert et Lambert-Zechovsky, 1999)

III.4.2.4.4. Hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique

Suite à une mutation au niveau des gènes de régulation, la production de la céphalosporinase naturelle peut devenir constitutive chez certaines souches dites « dérèprimées » qui sont dès lors capables de surproduire cette enzyme, ce qui affecte l'activité de l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes. Il existe différents niveaux de dérèpression de la céphalosporinase et le niveau de résistance observé est proportionnel à la quantité d'enzyme produite, la majorité des souches étant seulement partiellement dérèprimées. Ces souches sont donc résistantes ou intermédiaires à la céftazidime et malgré la plus grande stabilité du céfepime et du céfpirome, seule une minorité de souches demeure sensible à ces antibiotiques. Les inhibiteurs de bêta-lactamases sont peu ou pas efficaces. (Bert et Lambert -Zechovsky, 1999)

Tableau 4 : Effet des mécanismes de résistance sur les β -lactamines "antipyocyaniques" (étude effectuée sur 1000 souches différentes isolées en clinique, sauf pour a et b). (VEDEL, 1995)

PHENOTYPES									
Imperméabilité spécifique à l'imipénème									
Imperméabilité large									
Case hyperproduite (dépression totale)									
Case hyperproduite (dépression partielle)									
β -lactamase à spectre étendu (BSE)									
Pase haut niveau (OXA-?)									
Pase haut niveau (PSE/CARB)									
Pase bas niveau (OXA-1/OXA-4, etc. ; TEM)									
Sauvage									
ANTIBIOTIQUES	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.	\emptyset Int.
CARBOXYPENICILLINES									
Ticarcilline	28 \pm 3 S	14 \pm 5 I/R	6 R	6 R	6 R	15 \pm 5 I/R	6 R	16 \pm 4 I/R	27 \pm 3 S
Ticarcilline+Ac. Clavulanique	29 \pm 3 S	23 \pm 6 S/I	<12 R	11 R	<15 R	15 \pm 5 I/R	6 R	18 \pm 3 I/R	27 \pm 3 S
UREIDOPENICILLINE									
Pipéracilline	30 \pm 3 S	23 \pm 6 I	<13 R	13 R	<12 R	14 \pm 7 I/R	6 R	26 \pm 5 I/R	28 \pm 3 S
Pipéracilline+tazobactam	32 \pm 3 S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CEPHALOSPORINES									
Céforazone	28 \pm 3 S	22 \pm 6 I/R	<13 R	6 R	<10 R	12 \pm 5 I/R	6 R	21 \pm 3 I/R	25 \pm 3 S
Céfsulodine	27 \pm 3 S	23 \pm 6 I	<9 R	16 I/R	6 R	18 \pm 5 I/R	6 R	19 \pm 4 I/R	28 \pm 3 S
Céfotaxime	24 \pm 4 I	24 \pm 4 I	16 \pm 5 I	21 I	<10 R	<10 R	6 R	14 \pm 5 I/R	21 \pm 3 I
Latamoxef	25 \pm 3 I	25 \pm 6 I	<21 I/R	22 I	ND	<10 R	<14 R	16 \pm 3 I/R	23 \pm 3 I
Céfépime	31 \pm 3 S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Céfpime	29 \pm 3 S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Céftazidime	32 \pm 3 S	31 \pm 3 S	30 \pm 3 S	12 I/R	6 R	17 \pm 5 I/R	<14 R	28 \pm 4 I	31 \pm 2 S
MONOBACTAMS									
Aztréonam	32 \pm 3 S	33 \pm 3 S	30 \pm 3 S	30 S	<10 R	22 \pm 5 I/R	<16 R	22 \pm 3 I/R	31 \pm 2 S
CARBAPENEMES									
Imipénème	31 \pm 2 S	33 \pm 3 S	30 \pm 3 S	30 S	28 S	31 \pm 3 S	29 \pm 2 S	30 \pm 3 S	<19 R

Pase, pénicillinase ; Case, céphalosporinase ; BSE, β -lactamase à spectre étendu ; OXA, oxacillinase ; TEM, Temoniera ; PSE, *Pseudomonas*-specific enzyme ; CARB, carbénicillinase. Antibiotiques en premiers marqueurs observés lors de l'analyse phénotypique. \emptyset , diamètre de la zone d'inhibition ; \pm écart type. Int. Interprétation. S, activité Stable ; I, activité Instable ; R, activité Restreinte ou absente (l'interprétation en sensible, intermédiaire n'est pas toujours superposable). En effet, l'interprétation fondée sur les mécanismes de résistance est souvent plus sévère que celle basée sur les concentrations critiques). ND, \emptyset indéterminé. a, sur 10 souches ; b, sur 2 souches (résultat sous réserve).

LES
BETA-LACTAMASES

IV. LES BETA-LACTAMASES

IV.1. ORIGINE

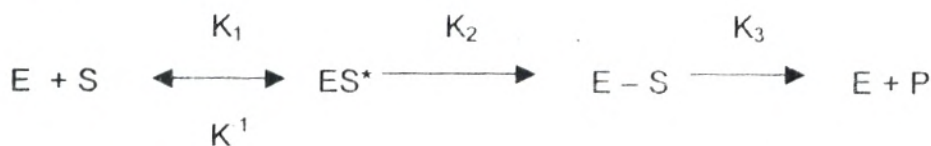
Toutes les β -lactamases (exceptées les métalloenzymes) et les PLPs ont en commun des séquences en acides aminés hautement conservées qui déterminent la structure et la fonction de la cavité du site actif. Ces données laissent suggérer qu'une enzyme ancestrale à activité transpeptidase, a évolué pour donner les D transpeptidases et les D carboxypeptidases d'une part et les β -lactamases d'autre part (Meideros, 1997).

IV.2. MECANISME D'ACTION

Les β -lactamases peuvent rendre les β -lactamines inactives par deux mécanismes, l'hydrolyse du cycle β -lactame ou la séquestration sans hydrolyse de l'antibiotique. (Sanders et Sanders, 1985 ; Sutherland, 1993).

IV.2.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le mécanisme de l'inactivation de la β -lactamine par la β -lactamase se fait selon une réaction d'acylation qui prend place entre le groupement carboxyl de la β -lactamine et le groupement hydroxyl de la sérine au niveau du site actif de l'enzyme. Ceci mène à la formation d'un complexe acyl-enzyme transitoire qui, rapidement désacylé, permet la libération de la β -lactamine sous forme inactive car le cycle β -lactame est ouvert. L'enzyme intacte est alors apte à attaquer une nouvelle molécule de β -lactamine. Ce mécanisme est représenté par l'équation suivante :



- E : Enzyme (β -lactamase)
- S : Substrats (β -lactamine)
- ES* : Complexe non covalent
- E-S : Complexe Acyl- Enzyme
- P : Produit inactif
- K₃ : Constante de déacylation
- K₂ : Constante d'acylation

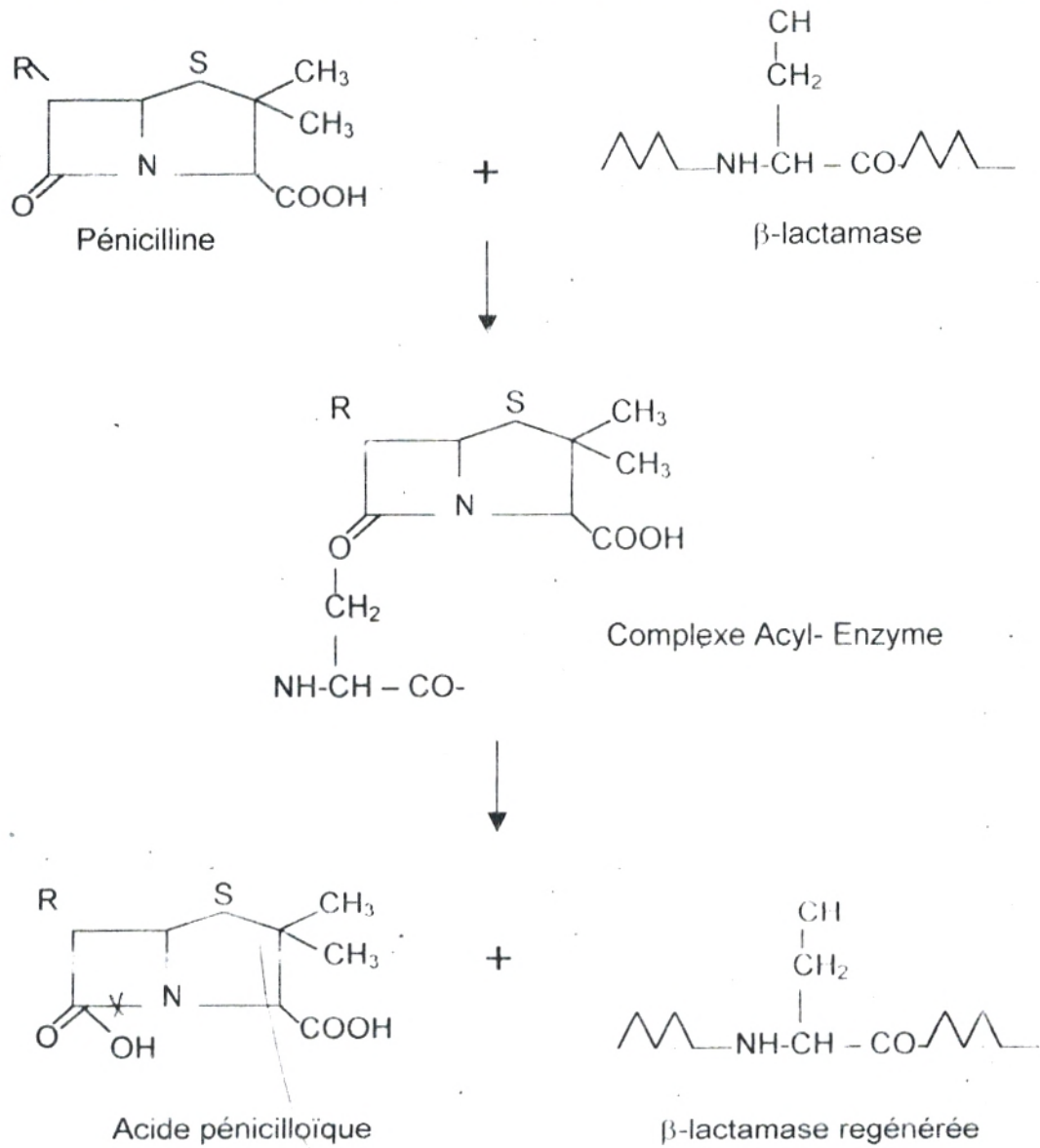


Figure 8: Schéma de l'hydrolyse enzymatique (Bryskier, 1999)

IV.2.2. LE MECANISME DE «NON-TRAPPING» OU SEQUESTRATION

Dans certains cas où l'affinité de l'enzyme pour l'antibiotique est très faible, les β -lactamases grâce à une surproduction peuvent rendre l'antibiotique inactif en le séquestrant sans hydrolyser l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible. Ce phénomène est apparu lors de l'utilisation des β -lactamines les plus récentes, les céphalosporines de deuxième et troisième génération (Weidmen, 1986 ; Vu et Nikaido, 1986).

IV.3. Classification des bêta-lactamases

La grande diversité des β -lactamases a suscité, depuis 1945, la publication d'articles visant à classer ces enzymes (Labia, 1999).

Actuellement, deux classifications s'imposent, l'une fondée sur la structure moléculaire de la protéine, dont le site enzymatique (classification d'Ambler) ; l'autre est basée sur les protéines hydrolytiques et la sensibilité aux inhibiteurs enzymatiques (classification de Syks et Richmond) (Meideros, 1984 ; Neu, 1988)

Selon la classification d'Ambler, on distingue quatre classes de β -lactamases : (Figure 9)

IV. 3.1. Classe A

Les enzymes de classe A sont principalement représentées par les pénicillinases. Ces enzymes sont actives sur les pénicillines mais aussi à un degré moindre sur les céphalosporines de première génération.

Plusieurs changements nucléotidiques dans certaines positions du gène de structure de ces enzymes ayant provoqué une ou plusieurs substitutions d'acides aminés. Celles-ci ont alors modifié la structure tertiaire de la protéine permettant la fixation des céphalosporines de troisième génération et par conséquent leur hydrolyse d'où le nom de β -lactamases à spectre étendu ou élargi (B.S.E.). (Arlet et Philippon, 1997)

IV. 3.2. Classe B

La classe B est composée par des métallo-enzymes qui contiennent du zinc. Ces molécules sont actuellement les seules à posséder une activité hydrolytique notable sur les carbapénèmes, ainsi ces enzymes confèrent à la bactérie un haut niveau de résistance. (Osano et al., 1994 ; Mazzariol et al., 1999 ; Panzig et al., 1999)

IV. 3.3. Classe D

Les enzymes de la classe D sont des pénicillinases de type oxacillinase (OXA). Elles présentent des caractères qui les rapprochent de la classe A au moins sur le plan de l'expression phénotypique de la résistance. Sur le plan génétique, ces deux classes diffèrent considérablement.

Les oxacillinase ont une activité hydrolytique élevée pour l'oxacilline et ses dérivés. (Bryskier, 1999)

IV. 3.4. Classe C

Elle regroupe les β -lactamases de type céphalosporinase résistantes à l'acide clavulanique, habituellement chromosomiques produites de façon constitutive ou inductible.

V.4. Inhibiteurs de β -lactamases

L'inhibiteur des β -lactamases associé à une β -lactamine protège celle-ci de l'inactivation enzymatique. De ce fait, il lui permet de conserver son activité vis-à-vis des bactéries productrices de β -lactamases. Actuellement trois inhibiteurs de β -lactamases sont utilisés en thérapeutique ; il s'agit de l'acide clavulanique, du sulbactam, et du tazobactam. Un quatrième, le probactam est en cours de développement.

Le sulbactam et le tazobactam sont des sulfones de l'acide pénicillanique (Figure 10). Le probactam est un dérivé bromé de l'acide pénicillanique. Alors que pour l'acide clavulanique, le soufre du thiazolidine est remplacé par un oxygène ce qui fait un clavame.

Le plus récent fût le BRL-42715 analogue des pénèmes ; plus efficace que le clavulanate, il inhibe la classe C insensible aux autres inhibiteurs (Bryskier, 1999).

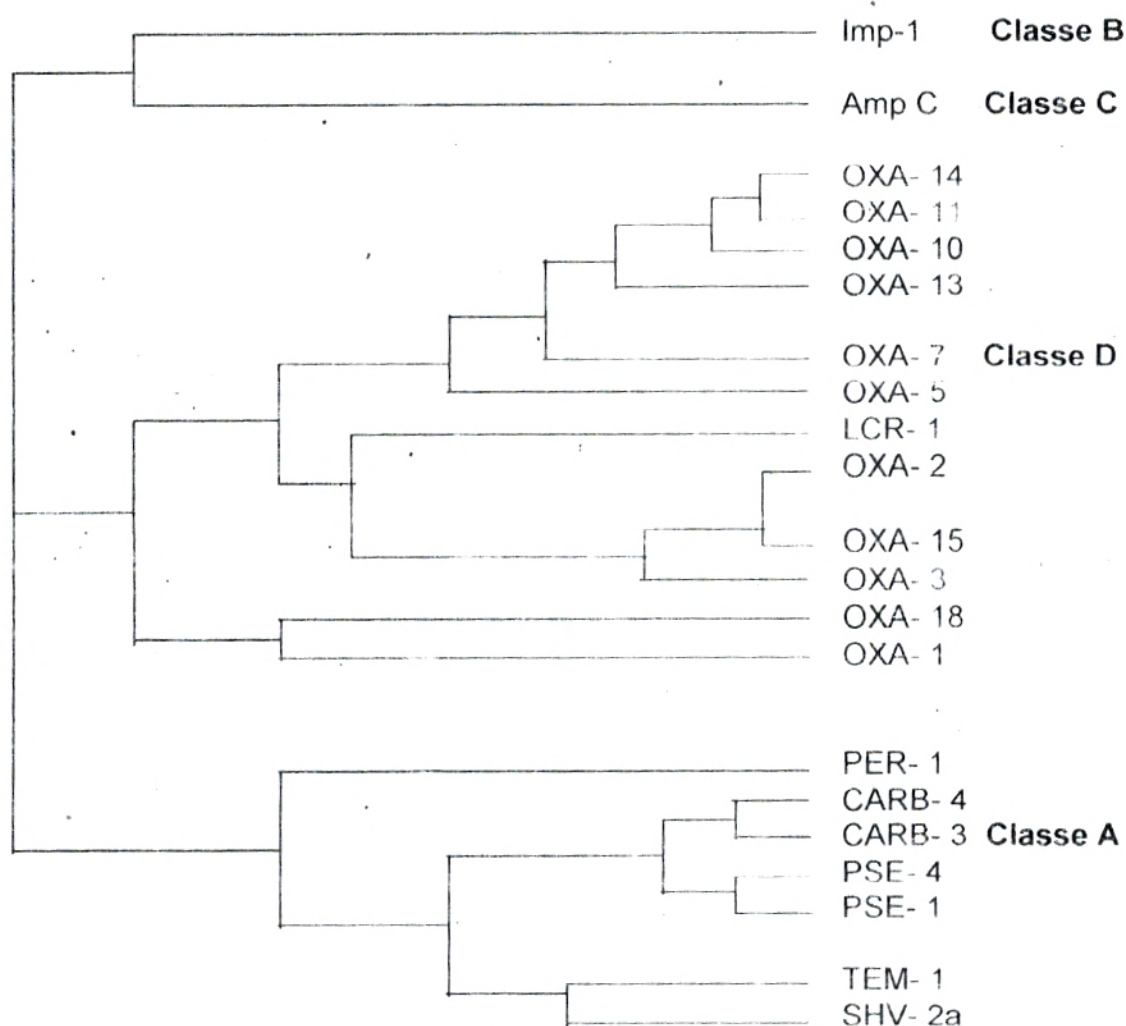


Figure 9: Classification de 21 β -lactamases identifiées chez *P. aeruginosa* selon leurs séquences en acides aminés (Dendrogramme) (Philippon, 1993)

Classe B : Carbapénèmes ou métalloenzymes (Imp – 1)

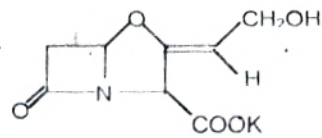
Classe C : Céphalosporinase chromosomique (Amp C)

Classe D : Oxacillines : OXA-2, OXA-3, OXA-5, OXA-7, OXA-10, OXA-3, OXA-20.

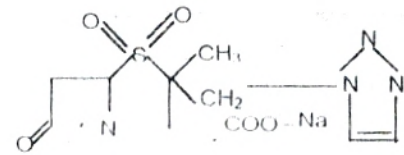
Oxacillines à spectre étendu : OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-18, OXA-19

Classe A : Pénicillines à large spectre : PSE-1, PSE-4, CARB-3, CARB-4.

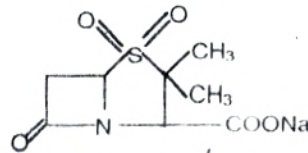
β -lactamases à spectre élargi ou étendu : TEM-1,2, SHV-2.



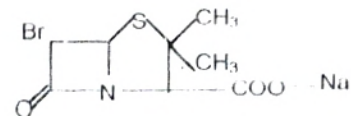
Acide clavulanique



Tazobactam



Sulbactam



Probactam

Figure 10 : Formules chimiques des inhibiteurs de β -lactamase

IV.4.1. MODE D'ACTION

Comme toutes les β -lactamines, les inhibiteurs de β lactamases ont un cycle β -lactame et peuvent donc se fixer sur les PLP. Cependant, ces inhibiteurs sont importants non pas du fait de leur rôle antibiotique propre souvent peu important voir même nul, mais du mécanisme de leur effet neutralisant sur les β -lactamases. Le clavulanate attaque le site catalytique, le groupement hydroxyle de la L-serine de l'enzyme interagit avec le groupement carboxyle du cycle β -lactame ; il se forme un complexe Acyl-enzyme stable, alors qu'il est transitoire avec les β -lactamines. Cette stabilité n'est jamais totale et une hydrolyse très lente par désacylation, peut libérer l'enzyme de son inhibiteur qui a subi des modifications (Bryskier, 1999).

Pseudomonas aeruginosa

ET

PHENOTYPES
DE RESISTANCE

V. *Pseudomonas aeruginosa* ET PHENOTYPES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES

V.1. Phénotypes de résistance naturelle

Ce phénotype est lié à la production inductible d'une céphalosporinase d'origine chromosomique et une médiocre perméabilité cellulaire. Ainsi, les souches sauvages de *Pseudomonas aeruginosa* sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, aux aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), aux céphalosporines de première génération (Céfalotine, Céfazoline), aux céphalosporines de deuxième génération (Céfoxitine, céfuroxime, et céfamandole), et présentent une sensibilité incertaine à certaines céphalosporines de troisième génération (céfotaxime et latamoxef). Cependant, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* développant leurs mécanismes de résistance naturelle sont sensibles aux carboxypénicillines (*carbénicilline*, ticarcilline), aux ureidopénicillines (pipéracilline) à certaines céphalosporines (céf sulodine, Céfopérazone, Céftazidime), aux monobactames (aztréonam), et aux carbapénèmes (imipénème) (Vedel, 1995).

V.2. Phénotypes de résistance acquise

Certaines souches sauvages de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent acquérir une résistance supplémentaire aux β -lactamines qui modifie le phénotype de résistance naturelle.

Cette résistance acquise peut être due, soit à la production de β -lactamases (pénicillinase, céphalosporinases, ...), soit à des mécanismes non enzymatiques (diminution de la perméabilité cellulaire, modification de la cible) (Tableau 4).

2.1. Résistance acquise par production de β -lactamases

V. 2.1.1. Pénicillinases constitutives à médiation plasmidique

V. 2.1.1.1. Phénotype pénicillinase bas niveau

Les souches développant ce phénotype produisent les pénicillinases de type oxacillinase (OxA₁, OxA₄,...) ou de type TEM (TEM₁ et TEM₂). Elles sont résistantes à bas niveau aux carboxypénicillines (ticarcilline), aux ureidopénicillines (pipéracilline), à la céfsulodine et à la céfopérazone.

Par contre, la Céfotaxime comme les monobactames (aztréonam) et la carbapénèmes (imipénème) sont stables vis à vis de ces enzymes. Le céfotaxime et le latamoxef sont également stables mais peu actifs en raison de l'imperméabilité naturelle de *Pseudomonas aeruginosa*.

V. 2.1.1.2. Phénotype pénicillinase haut niveau

Ce phénotype est la plupart du temps dû à la production de pénicillinases dénommées « *Pseudomonas* spécifique enzymes » ou carbénicillinases (PSE₁/CARB₂, PSE₄/CARB₁,...).

Le comportement des souches productrices de ces enzymes est à peu près similaire à celui observé dans le phénotype précédent. Cependant, la résistance est plus élevée aux carboxypénicillines, aux ureidopénicillines, à la céfopérazone, et à la céfsulodine. Les céphalosporines non hydrolysables par ces pénicillinases, comme le céfotaxime, le latamoxef, la céftazidime, les monobactames, les carbapénèmes, conservent la même activité ; néanmoins, certains enzymes comme (OXA₂) sembleraient hydrolyser la céftazidime.

V. 2.1.2. Céphalosporines constitutives à médiation chromosomique

La sélection de variants hyperproducteurs de céphalosporinases a été observée chez *Pseudomonas aeruginosa* qui produit naturellement cet enzyme inducible.

L'hyperproduction de céphalosporinase est due à une mutation des gènes régulateurs (mutant dérèprimé). La dérèpression peut être complète, entraînant la synthèse constitutive à haut niveau de la β -lactamase. Elle peut être partielle, dans ce cas, l'inductibilité est conservée mais le taux bas de synthèse enzymatique est plus important par rapport au phénotype sauvage. Cette

Dans le cas du phénotype de l'imperméabilité spécifique à l'imipénème, on invoque la perte de la protéine D₂.

V. 2.2.2. Phénotype modification de la cible

Ce mécanisme d'origine chromosomique, très rarement observé chez *Pseudomonas aeruginosa* et difficile à mettre en évidence

V.2.3. Nouveaux phénotypes de résistance

La résistance évolue, et de nouveaux phénotypes apparaissent, l'un de ces phénotypes est dû à un mécanisme déjà décrit (l'efflux actif). Ce mécanisme résulterait de l'expression plus importante des processus d'expulsion de l'antibiotique. D'autres nouveaux phénotypes sont dus à des mécanismes encore inconnus. (Vedel, 1995)

V. 2.4. Phénotypes complexes de résistances acquise

Ces mécanismes de résistance acquise, précédemment décrits, peuvent être intriqués :

- Production de pénicillinase plasmidique + modification de la perméabilité cellulaire.
- Hyperproduction de céphalosporinase + modification de la perméabilité cellulaire.
- Production de pénicillinase plasmidique + hyperproduction de céphalosporinase, etc.

Il en résulte des phénotypes complexes. (Vedel, 1995)

CONJUGAISON
BACTERIENNE
ET
CURAGE

VI. CONJUGAISON BACTÉRIENNE ET CURAGE

VI.1. Conjugaison bactérienne

La propriété la plus spectaculaire des plasmides est sans doute leur caractère transférable. Ils peuvent en effet passer d'une bactérie à une autre appartenant à la même espèce ou à une autre espèce. Ce transfert génétique peut s'effectuer selon les trois modes suivants : conjugaison, transduction et transformation.

La conjugaison est probablement le mode de transfert le plus efficient. Elle joue un rôle déterminant dans la dissémination des plasmides, notamment de résistance aux antibiotiques.

Il s'agit d'un transfert effectué au moyen d'une machinerie synthétisée à cet usage. Il y a interaction entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice au moyen d'un type spécial de pili qu'on appelle pili sexuels. Le pilus sexuel est codé par le plasmide lui-même qui est donc le seul promoteur de son propre transfert.

Après amarrage des bactéries, un pont cytoplasmique se forme entre eux, par lequel passe l'ADN plasmidique sous forme monocaténaire. Le succès du transfert est conditionné par la réplication du plasmide au sein de la bactérie donatrice et de son nouvel hôte. Or, précisément tous les plasmides ne sont pas capables de coloniser n'importe quel hôte, on parle de spectre d'hôte. De plus, la plupart des espèces bactériennes disposent d'un système enzymatique (endonucléases) dit de « restriction » qui scinde tout ADN qui a été synthétisé par une bactérie appartenant à une autre espèce bactérienne. A ce système de « restriction » est lié un système de « modification » chargé du marquage de l'ADN hôte étranger. Ces systèmes « restriction-modification » d'ADN agissent sur les plasmides. Ils contribuent donc, tout comme la spécificité d'hôte, à freiner la propagation des plasmides au sein du monde bactérien.

En milieu hospitalier, le brassage des souches et la pression des antibiotiques permettent des échanges d'ADN plasmidique entre les bactéries aboutissant à compléter leur stock génétique ; on obtient ainsi des souches multirésistantes (Bousquet et Jacob, 1982).

Dans ce sens, Gotoh et al. (1990) ont pu isoler des mutants résistants à la céf sulodine à partir de *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.O. 4089) une souche dépourvue de β - lactamase d'origine chromosomique. Cette résistance a été transféré à deux nouvelles souches de la même espèce par phénomène de conjugaison ; l'ensemble des mutants et des transconjugants étaient devenus non seulement résistants à la céf sulodine mais aussi à la céftazidime, céfotaxime, céfmenoxime, céftizoxime, latamoxef, carbénicilline, et la céfopérazone.

Lenon et Dericco (1991) sont arrivés à transférer le plasmide R751 d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à une autre de *Pseudomonas cepacia*, cette dernière qui est phytopathogène a été incriminée dernièrement dans des infections nosocomiales ; le plasmide R751 code pour la résistance au triméthoprim (l'un des antibiotiques les plus actifs sur *Pseudomonas cepacia*). Les transconjugants obtenus ont été utilisés comme donneurs pour un deuxième transfert vers de nouvelles souches de *Pseudomonas cepacia*. Le résultat a été le passage du plasmide R751 et la dissémination de cette résistance au triméthoprim.

Hupkova et al.(1993) ont réussi à transférer par conjugaison la résistance à l'imipénème à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à une autre souche sensible de la même espèce. Le passage de cette résistance a été accompagné par l'acquisition d'une résistance à dix autres antibiotiques.

VI.2. Elimination des plasmides (Curage)

Le curage est l'une des importantes démonstrations de la nature plasmidique d'un ou de plusieurs caractères de résistance aux antibiotiques.

Le principe consiste à cultiver une souche possédant le plasmide en présence d'une substance curante qui provoquera une perte de plasmide. (Bouanchaud et Chabbert, 1977).

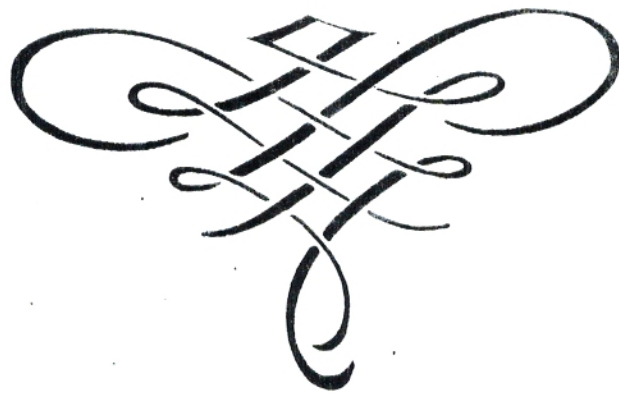
Selon Courvalin et al. (1985) les agents qui inhibent sélectivement la réplication plasmidique entraînent la perte simultanée de l'ensemble des résistances portées par le plasmide .

Cette perte plasmidique spontanée varie selon les plasmides et les souches mais elle est de l'ordre de 1/1000. (Gerbaud, 1983)

La capacité d'éliminer les plasmides des bactéries hôtes a été rapporté pour un nombre de composés tels que le bromure d'éthidium, l'orangé d'acridine qui s'intercalent dans la molécule d'ADN provoquant ainsi une distorsion du squelette « sucre phosphate ».

Mis à part le curage par des agents chimiques, il existe des agents physiques telles que la radiation ultraviolette et la température qui perturbent la réplication des plasmides entraînant ainsi leur élimination.(Bouanchaud et Chabbert,1961)

MATÉRIELS
&
MÉTHODES



I. MATERIELS

I.1. Matériel biologique

- **Souches objet de l'étude** : 100 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées et identifiées par nos soins à partir de prélèvements de plaies suppurées, d'escarres et d'urines de malades et de l'environnement hospitalier, au niveau du service de Chirurgie de l'Hôpital de Tlemcen.
- **Souche de référence** : *E.coli* K12 résistante à l'acide nalidixique et à la Rifampicine (ATCC 25922).
- **Antisérum anti-O** de *Pseudomonas aeruginosa* (Institut Pasteur de Paris)

I.2. Milieux de culture

- **Milieux de culture solides**
 - Milieu d'isolement sélectif pour *Pseudomonas* (GSP) (Merck)
 - Mac Conkey (MC) (Institut Pasteur d'Algérie)
 - Mueller Hinton (MH) (Institut Pasteur d'Algérie)
- **Milieux de culture liquides** (Institut Pasteur d'Algérie)
 - Bouillon nutritif (BN)
 - Bouillon cœur cerveau (BHIB)

I.3. Galeries biochimiques

- Galeries Pasteur API 20 E
- Galeries Pasteur- *Pseudomonas*

I.4. Antibiotiques

En disques

La liste des antibiotiques en disque utilisés complétée par les normes de lecture selon CHABBERT (1984) est citée dans le tableau 5.

En poudre

Amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline, céfazoline, céfotaxime, imipénème, colistine, ampicilline, gentamycine, rifampicine, Pénicilline

I.3. Solutions et tampons

- Tampon Phosphate : mélange de solutions A (39ml) et B(61ml)
- Solution A : KH_2PO_4 (68,08 g/l) (39 ml),
- Solution B : $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ (89,70
- Solution de Benzylpénicilline à 5 mg/l.
- Solution iodée suivante: iode 1g -iodure de sodium 27 g -eau distillée- 50 ml.
- Gélose contenant de l'amidon :
 - 1g d'agarose dans 80 ml de tampon phosphate à 0,5 M.
 - 0,3g d'amidon dans 20 ml de tampon phosphate à 0,5 M.

Tableau 5: Concentrations et diamètres des zones d'inhibition critiques correspondant à la sensibilité et à la résistance vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques (Antibiogramme Pasteur, 1989)

Famille d'antibiotique	Antibiotiques	Symbole du disque	Concentration critique (mg/l)		Diamètres des zones d'inhibition en (mm)		Charge du disque
β-lactamines	- Ampicilline	AM	≤ 4	>16	≥17	<11	10 µg
	- Amoxicilline +acide clavulanique	AMC	≤ 4	>16	≥21	<14	20 µg+ 10 µg
	- Ticarcilline	TiC	≤ 16	>64	≥22	<18	75 µg
	- Piperacilline	PiP	≤16	>64	≥18	<12	75 µg
	- Oxacilline	OX	≤2	>2	≥20	<20	5 µg
	- Imipénème	IPM	≤ 4	> 8	≥22	<17	10 µg
	- Céfalotine	CF	≤ 8	>32	≥18	<12	30 µg
	- Céfazoline	CZ	≤ 8	>32	≥18	<12	30 µg
	- Céfoxitine	FOX	≤ 4	>32	≥22	<15	30 µg
	- Céfotaxime	CTX	≤ 4	>32	≥21	<15	30 µg
	- Céfazidime	CAZ	≤ 4	>32	≥21	<15	30 µg
	- Céfopérazone	CFP	≤ 4	>32	≥21	<14	30 µg
	- Ticarcilline-acide clavulanique	TCC	≤16/2	>64/2	≥22	<18	75µg+10µg
	- Aztréonam	ATM	≤ 4	>32	≥23	<17	30µg
	- Latamoxef	MOX	≤ 4	>32	≥23	<17	30µg
	- Pipéracilline+Tazobactam	TZP	≤8/4	>64/4	≥21	<14	75µg+10µg
	- Céfpirome	CPO	≤4	>32	≥21	<15	30µg
	- Céfépime	FEP	≤4	>32	≥21	<15	30µg
- Césulodine	CFS	≤ 8	>32	≥22	<14	30 µg	
Aminosides	- Kanamycine	K	≤ 8	>16	≥17	<15	30 µg
	- Néomycine	N	≤ 8	>16	≥17	<15	30 µg
	- Tobramycine	TM	≤ 4	>18	≥16	<14	30 UI
	- Amikacine	AN	≤ 8	>16	≥17	<15	30 UI
	- Gentamicine	GM	≤ 4	> 8	≥16	<14	10 µg
	- Nétilmicine	NET	≤ 4	> 8	≥19	<17	30 µg
Tétracyclines	- Tétracycline	TE	≤ 4	> 8	≥19	<17	15 µg
	- Doxycycline	DO	≤ 4	> 8	≥19	<17	30 µg
Macrolides	- Clindamycine	L	≤ 2	> 8	≥21	<17	30 UI
Polypeptides	- Colistine	CS	≤ 2	>2	≥15	<15	30 UI
Sulfamides et associations	- Triméthoprime	TMP	≤4	>8	≥16	<12	5 µg
	- Triméthoprime + sulfamides	SXT	≤2/38	>8/152	≥16	<10	1,25 µg+23,75µg
Nitrofuranes	- Furanes	FT	≤ 25	>10	≥17	<14	300 µg
Quinolones	- Acide oxolinique	OA	≤ 2	> 4	≥20	<17	10 µg
	- Acide pipémidique	PI	≤ 8	>16	≥19	<14	20 µg
	- Péfloxacine	PEF	≤ 1	> 4	≥22	<16	5 µg
Divers	- Rifampicine	RA	≤ 4	>16	≥19	<14	30 µg
	- Fosfomycine	FOS	≤ 32	>32	≥14	<14	50 µg

II.

II.1.

Passer un écouvillon sur une plaie par exemple, le tube est placé dans un tube contenant 5ml de bouillon nutritif, le tube est ensuite transporté à l'étuve pour une incubation à 37°C pendant 24 heures

II.2. Isolement et purification

L'isolement a été réalisé sur gélose Mac Conkey, ce milieu permet l'inhibition de la flore Gram positive, ainsi que la mise en évidence du caractère lactose. Les *Pseudomonas* arrivent à croître sur ce milieu et donnent des colonies incolores à lactose négatif, certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* se présentent sous forme de grandes colonies muqueuses.

La purification des souches a été obtenue par repiquage successif sur bouillon nutritif puis sur gélose Mac Conkey ou gélose GSP.

II.3. Identification

II.3.1. Galerie classique

Lorsque l'examen microscopique (coloration de Gram) a révélé que l'isolat est un bacille à Gram négatif, nous avons procédé à son identification par des tests biochimiques décrits par Doudoroff et Palleroni (1974).

Cette identification a été réalisée selon les techniques décrites dans Marchall et al. (1991).

II.3.1.1. Test d'oxydase

Les disques prévus pour ce test sont imprégnés d'oxalate N diméthyl phénylène diamine, ce réactif est oxydé au contact du cytochrome des bactéries oxydases positives, cette oxydation se traduit par une coloration violette foncée.

II.3.1.2. Détermination du type respiratoire

Cette épreuve consiste à ensemercer par piqûre centrale les souches dans une gélose viande-fôie contenue dans des tubes de prévôt ; Les *Pseudomonas* sont des aérobies stricts, ils ne cultivent qu'en surface.

II.3.1.3. Détermination du type de métabolisme du glucose

Le glucose peut être métabolisé soit par voie fermentaire où la quantité d'acides est importante, soit par voie oxydative qui ne donne naissance qu'à de petites quantités d'acide. Pour ce test, deux tubes de milieu MEVAG sont ensemençés par piqûre centrale, l'un sera étuvé tel quel, l'autre sera recouvert d'une couche de 1 à 1,5 cm d'épaisseur de paraffine stérile.

Les deux tubes sont mis à l'étuve pour une incubation de 24 h à 30°C. Le processus oxydatif se traduit par l'absence de culture ou par une culture grêle et pas d'acidification dans le tube fermé. On n'observe jamais de dégagement de gaz dans le tube ouvert, une acidification modérée et assez lente débutant à la surface en 24- 48 heures ou parfois d'avantage.

II.3.1.4. Test des trois sucres

Le milieu T.S.I. permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, lactose, saccharose ainsi que la production d'H₂S.

L'ensemencement se fait par stries sur la pente puis par piqûre centrale dans le culot, les *Pseudomonas* laissent ordinairement le culot et la pente inchangés et ne produisent pas de gaz. Certaines souches alcalinisent le milieu, cela est dû à la voie oxydative, qui entraîne la formation d'une petite quantité d'acides qui sera masquée par les produits résultant de la dégradation d'acides aminés.

II.3.1.5. Détermination de la production de pigments

Pour l'étude de la production de pigments, deux milieux sont utilisés (KING A et KING B), l'ensemencement se fait par une strie médiane dans les deux tubes contenant respectivement le milieu KING A et KING B. L'incubation est à 30°C pendant 1 à 4 jours.

Le milieu KING A permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* en favorisant la production de pyocyanine ; les cultures typiques sont colorées en bleu-vert parfois en brun-rose (pyorubrine). La pyocyanine est soluble dans le chloroforme.

Le milieu KING B favorise la synthèse de pigment vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*), le pigment fluorescent n'est pas soluble dans le chloroforme.

L'incubation peut durer 1 à 3 semaines.

II.3.1.6. Test du mannitol mobilité

L'ensemencement se fait par piqûre centrale et l'incubation est à 30°C pendant 18 à 24 h, la majorité des *Pseudomonas* sont mobiles et arrivent à dégrader le mannitol par voie oxydative (culture en aérobiose).

II.3.1.7 Test de Simmons

L'ensemencement se fait selon une strie longitudinale et l'incubation est à 30°C pendant cinq jours.

Les *Pseudomonas* utilisent en général le citrate en provoquant une alcalinisation ce qui entraîne le virage de l'indicateur de pH au bleu.

II.3.1.8 Test de croissance à 42°C

La capacité de croître à 42°C est l'un des caractères les plus importants permettant la différenciation entre les espèces; ainsi *Pseudomonas aeruginosa* peut croître à cette température; alors que *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* n'ont pas cette capacité.

II.3.2. Galerie *Pseudomonas* (Institut Pasteur de Paris)

L'identification de *Pseudomonas aeruginosa* a été confirmée par la galerie Pasteur, spécifique au *Pseudomonas*. L'utilisation de cette galerie (ensemencement, révélation, lecture et interprétation des résultats) a été faite selon les indications du fournisseur.

II.3.3. Galerie API 20 E (Institut Pasteur de Paris)

Lorsque le résultat des tests classiques cités précédemment a correspondu aux critères de *Pseudomonas*, nous avons procédé à un complément d'identification par la galerie API 20 E, destinée aux bacilles à Gram négatif. L'utilisation de cette galerie (ensemencement, révélation, lecture et interprétation des résultats) a été faite selon les indications du fournisseur. Outre l'identification proprement dite, déjà largement confirmée par les galeries

précédente, la galerie API 20 E permet, sur la base de caractères secondaires, de déterminer d'éventuels biotypes de *Pseudomonas*.

II.4. Antibiorésistance

II.4.1. Antibiogramme :(Communiqué 2000-2001, Société Française de Microbiologie)

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en terme d'efficacité clinique : la bactérie est classée dans les catégories sensible (S), intermédiaire (I), ou résistante (R).

Principe

Des sources ponctuelles d'antibiotiques constituées par des disques sont déposées à la surface d'une gélose ensemencée.

L'antibiotique diffuse en produisant un gradient de concentration décroissant. Après 18 heures d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et interprétés d'après des diamètres critiques. (Tableau 6)

Technique

- Ensemencer 5 ml de BHIB avec une colonie de la souche à tester et incubé 18 h à 37°C.
- A partir de cette culture, réaliser une dilution au 1/100 dans de l'eau physiologique.
- Homogénéiser au vortex.
- Ensemencer par inondation les boîtes de gélose MH avec les dilutions.
- Aspirer le surplus à l'aide d'une pompe à vide.
- Laisser sécher les boîtes de Pétri 15 à 20 minutes à 37°C.
- Déposer les disques d'antibiotiques à tester à l'aide d'un distributeur à raison de 6 disques par boîte.
- Laisser les boîtes 20 min à température ambiante pour permettre une prédiffusion de l'antibiotique.
- Incuber pendant 18 à 24.h à 37°C.

Lecture

- Mesurer les différents diamètres de la zone d'inhibition.
- Reporter les mesures sur l'échelle de concordance de l'antibiogramme Pasteur pour déterminer si la souche est résistante, intermédiaire, ou sensible.

II.4.2. Analyse phénotypique de la résistance aux bêta-lactamines

Principe

L'interprétation de l'antibiogramme en résistant, sensible et intermédiaire n'est pas toujours suffisante concernant la résistance aux bêta-lactamines ; en effet, afin d'éviter tout échec thérapeutique, il est indispensable de détecter les mécanismes de résistance développée par la bactérie.

La mise en évidence des phénotypes de résistance chez les souches de *Pseudomonas* a été effectuée à l'aide de 4 molécules utilisées comme marqueurs de détection : la Ticarcilline, le Céfotaxime, la Ceftazidime et l'Imipénème.

Technique

- Ensemencer 2 boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton par la technique d'inondation (voir antibiogramme).
- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un applicateur et dans un ordre précis (Figure 11) : 13 antibiotiques sont utilisés dont les principaux marqueurs (Ticarcilline, Céfotaxime, Céfotaxime et Imipénème). Les autres antibiotiques peuvent être contributifs pour la mise en évidence de certaines images de synergie et d'antagonisme et pour la détermination de certains phénotypes complexes.

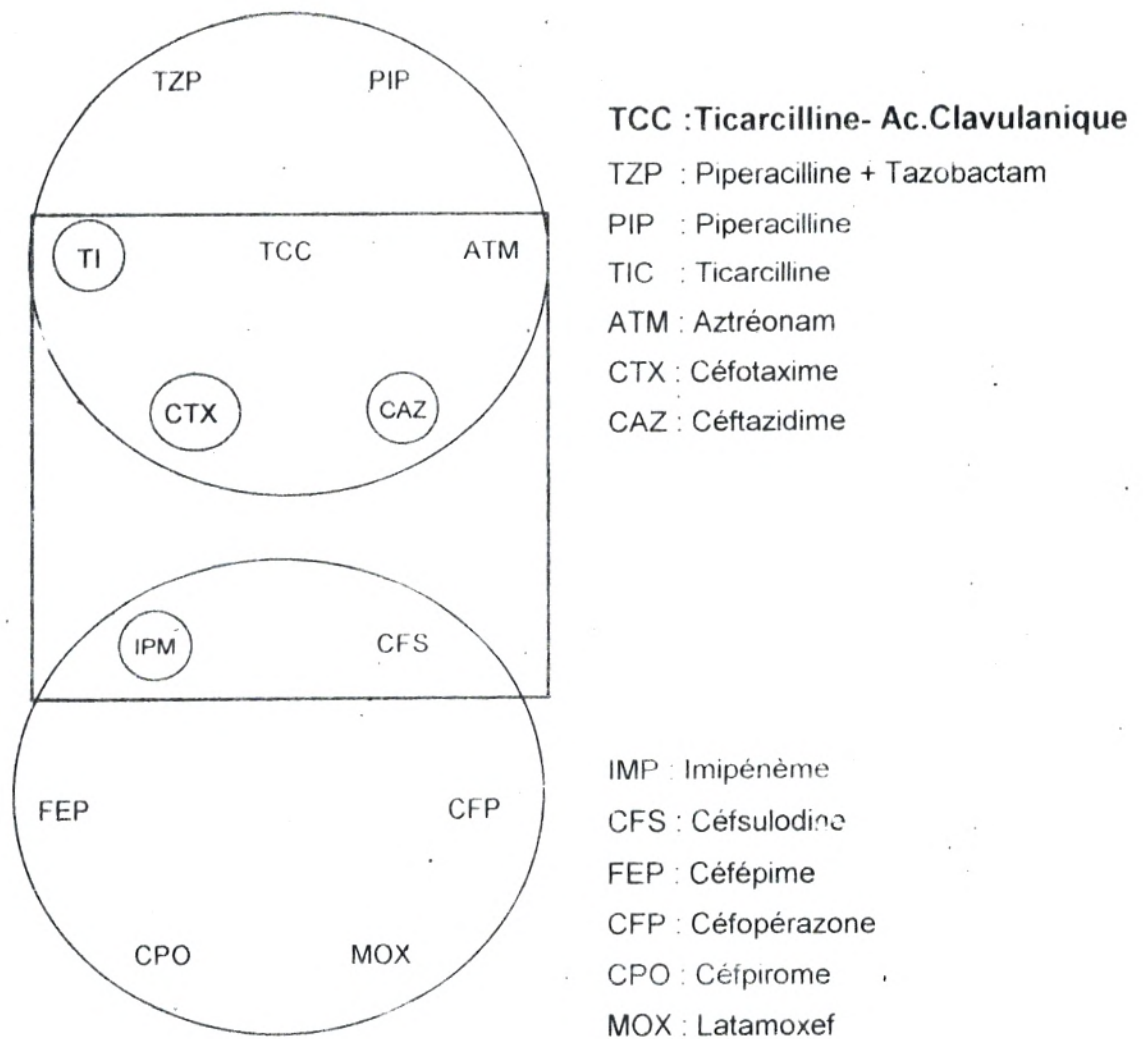


Figure 11 : Antibiogramme selon le schéma de Vedel (Vedel, 1995).

A l'intérieur du carré rouge, antibiotiques utilisés comme paramètres principaux de détection des phénotypes de résistance. Antibiotiques en vert, premiers marqueurs observés lors de l'analyse phénotypique

Lecture

Le schéma de VEDEL nous permet de voir des images de synergie et d'antagonisme, si elles existent, entre les β -lactamines et de classer les souches selon leurs phénotypes.

Pour la synergie: l'effet est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration, donc la synergie est le résultat d'une bonne association d'antibiotiques. Lorsqu'elle est observée entre deux disques de β -lactamines, elle nous permet de confirmer aisément la production de pénicillinases (in vitro)

Pour l'antagonisme : l'association diminue l'activité de l'un ou de l'autre des antibiotiques, son activité est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique pris indépendamment. In vitro, l'image d'antagonisme s'observe par une diminution de la zone d'inhibition autour d'un disque de β -lactamine en face d'une autre β -lactamine très inductrice (imipénème).

II.4.3. Test d'induction

Principe (Phillips, 1988)

Le caractère inductible de la biosynthèse d'une β -lactamase a été mis en évidence par la méthode de diffusion en milieu solide (MH) ; il se traduit par une image d'antagonisme entre un antibiotique inducteur, l'imipénème ou la céfoxitine et une β -lactamase active sur la souche testée.

Technique (Lindh et al., 1990)

Elle comporte les mêmes étapes que la technique de l'antibiogramme. On dépose un disque d'imipénème à 3 cm, centre à centre, du disque de la β -lactamine active, la pipéracilline, sur le milieu MH uniformément ensemencé par la suspension bactérienne. On incube pendant 18 h à 37°C.

Lecture

L'induction de β -lactamase a eu lieu si le rayon de la zone d'inhibition comprise entre les disques des antibiotiques testés et l'antibiotique inducteur diminue nettement (≥ 4 mm), produisant une zone semi-circulaire et donnant ainsi l'image classique d'antagonisme (voir figure 12).

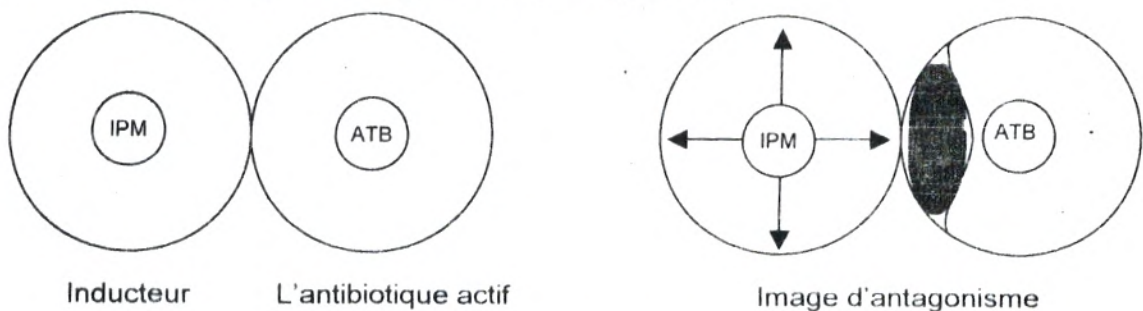


Figure 12 : Schéma représentant l'antagonisme

II.4.4. Test de synergie : Recherche de β -lactamases à spectre élargi

Principe : (Jarlier, 1988)

Le test de synergie permet la détection des β -lactamases à spectre élargi chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, se traduisant sur l'antibiogramme standard par une image de synergie entre un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (céfotaxime et/ou céftazidime) et un disque contenant de l'acide clavulanique (Augmentin®).

Technique(Aubert et al., 1990 ; Bernard et al., 1992)

On met en présence sur milieu MH préalablement ensemencé avec la souche à tester, les disques de l'Augmentin® à une distance de 3 cm, centre à centre, des disques d'antibiotiques testés (Céftazidime, Céfusulodine, Céfotaxime).

On incube pendant 18 h à 37°C.

Lecture

Une souche produit une β -lactamase à spectre élargi s'il y a augmentation du rayon d'inhibition ≥ 4 mm de la céphalosporine de 3^{ème} génération et de l'Augmentin®.

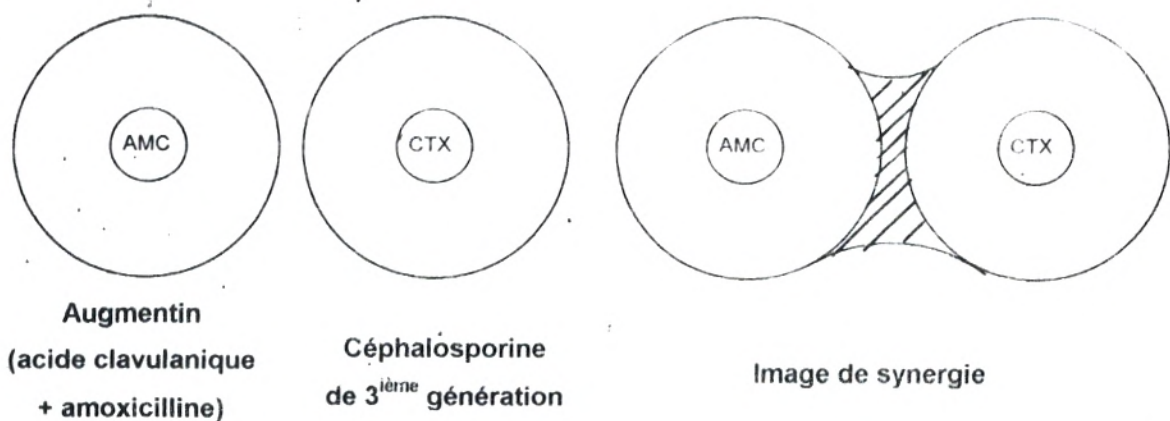


Figure 13 : Schéma d'une image de synergie

II.4.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu liquide (Courvalin et al., 1985)

1^{er} jour

- Préparer une solution mère de l'antibiotique à tester dans l'eau distillée, à une concentration dix fois supérieure à la concentration finale souhaitée. Réaliser une gamme d'au minimum 8 dilutions afin d'encadrer par trois ou quatre dilutions la valeur supposée de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la souche à étudier.
- Préparer une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier : repiquer 0,3 ml de la culture de 18 heures dans 10 ml de bouillon M.H. (ou autre bouillon adéquat pour la bactérie étudiée).
- Mettre au bain-marie agité à 37°C pendant 3 à 5 heures jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence (environ 5×10^7 bactéries /ml).
- Ajouter 1ml de ce bouillon à 10 ml de bouillon M.H. préalablement chauffé à 37°C.
- Distribuer 1,8 ml de ce bouillon dans les tubes à hémolyse
- Ajouter 0,2 ml d'eau distillée dans un tube témoin de culture
- Ajouter 0,2 ml de la gamme d'antibiotique dans chaque tube en allant de la concentration la plus faible à la concentration la plus forte. Bien agiter les tubes.
- Incuber 18 heures à 37°C.

2^{ème} jour

- Bien agiter les tubes avant la lecture.
- Définition de la CMI : c'est la concentration d'antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible.

II.5. Sérotypage

Principe

C'est une méthode d'utilisation facile, fournissant une information indispensable et, parfois suffisante pour les enquêtes épidémiologiques, elle est basée sur l'agglutination d'une suspension bactérienne vivante avec un sérum anti-O.

Les immuno-sérums anti-O sont obtenus sur lapin auquel on inocule des suspensions bactériennes chauffées (l'antigène H thermolabile est ainsi détruit). La spécificité est ensuite obtenue par saturation croisée.

Pour faciliter le typage, quatre mélanges de sérums sont préparés et désignés par le sigle PMA, PME, PMC, PMF. Leur composition est la suivante :

$PMA = P1 + P3 + P4 + P6$

$PMC = P9 + P10 + P13 + P14$

$PME = P2 + P5 + P15 + P16$

$PMF = P7 + P8 + P11 + P12$

Il existe donc 16 sérums monovalents numérotés de 1 à 16.

Technique

- Prélever les bactéries à la surface d'une gélose assez sèche cultivée à 37°C depuis 16 à 24 h.
- Mettre ces bactéries en suspension très homogène, par adjonction progressive du sérum avec l'anse de platine. L'agglutination O apparaît en quelques minutes, elle est fine et régulière et se distingue très facilement des colonies bactériennes mal émulsionnées éventuellement présentes.
- Rechercher ensuite l'agglutination à l'aide de sérum spécifique entrant dans la composition du sérum mélange ayant donné une agglutination nette.

II.6. Détection de β -lactamases (Courvalin et al., 1985)

En pratique, la détection seulement qualitative des différentes β -lactamases se fonde sur la modification du cycle β -lactame ouvert, s'accompagnant de la formation d'acide pénicilloïque pour les pénicillines et céphalosporoïque pour les céphalosporines.

II.6.1. Test iodométrique

Principe

C'est une technique de détection rapide des β -lactamases, basée sur la réduction du complexe iodo-amidon par l'acide pénicilloïque libéré après action de la β -lactamase. Le déplacement de l'iode entraîne un éclaircissement de la coloration violette initiale.

Technique

- Faire dissoudre puis porter à ébullition d'une part 0,3 g d'amidon dans 20 ml de tampon phosphate 0,5M (pH7) et d'autre part 1 gr d'agarose dans 80 ml de la même solution tampon.
- Une fois limpides, ramener les deux solutions à une température de 55°C au Bain-Marie.
- Mélanger les deux solutions, puis ajouter 2 ml d'une solution iodo-iodurée et 3 ml d'une solution de Benzylpénicilline (5 mg/ml), bien homogénéiser le tout.
- Laisser refroidir, puis couler le gel tout en faisant des puits de 4-5 mm de diamètre séparés de 3 cm.
- Une fois le gel solidifié, remplir les puits avec 20 μ l d'une culture bactérienne de 18h-24h à 37°C.

Lecture et interprétation

Réaction positive : une zone circulaire décolorée apparaît autour des puits après 20 à 30 minutes et tend à s'agrandir avec le temps. La lecture peut encore se faire après 2 à 4 heures.

Réaction négative : aucune modification de coloration n'est observée même après 24 h.

II.6.2. Test acidimétrique (Courvalin et al., 1985)

Le principe de ce test repose sur la modification du pH qui, après hydrolyse de la β - lactamine, devient acide et provoque le virage de l'indicateur de pH.

Préparation de la solution de révélation

- Solubiliser 5 millions d'unités de benzylpénicilline dans 4,5 ml d'eau distillée en présence de quelques gouttes de NaOH (1N).
- Ajouter 0,5 ml d'une solution de rouge de phénol à 0,5 %.
- Le pH obtenu doit être de l'ordre de 8,5. Cette solution a une couleur rouge pourpre, elle doit être préparée extemporanément.

Mode opératoire

- A partir d'une culture de 18h à 37°C sur Mueller Hinton, préparer une suspension bactérienne assez dense dans de l'eau physiologique. Le pH de cette suspension doit être de l'ordre de 8.
- Ajouter à cette suspension, 3 gouttes de la solution de révélation.
 - ❖ Témoin négatif : 3 gouttes de la solution révélatrice dans 0,5 ml d'eau distillée stérile.
- Laisser les tubes à température ambiante, pendant quelques minutes.

Lecture

- Réaction positive : modification de la coloration du mélange du violet au jaune, observée souvent en moins de 2 minutes mais parfois après quelques minutes.
- Réaction négative : pas de modification immédiate de couleur.

Remarque : Après plusieurs heures d'incubation à température ambiante, il y a hydrolyse spontanée de l'antibiotique.

II.6.3. Test PADAC

C'est un test chromogénique de recherche des β - lactamases encore plus rapide que le test iodométrique.

Principe

Le test est constitué d'une poudre déshydratée de céphalosporine chromogène : pyridine 2 azodiméthyl - aniline céphalosporine (PADAC). Celle-ci est solubilisée dans du tampon phosphate (pH 7,2) ou de l'eau distillée stérile à pH neutre.

Technique

Prélever quelques colonies bien isolées et les homogénéiser dans le réactif reconstitué, incuber à 37°C pendant quelques minutes.

Lecture

Une réaction positive se traduit par le passage du gris violet au jaune en 5 min au maximum.

En l'absence de bêta-lactamase, le composé reste intact.

II.7. Extraction de l'ADN plasmidique (KADO ET LIU, 1981)

Principe

C'est une technique rapide permettant l'extraction de plasmides de différentes tailles. En effet, elle est particulièrement bien adaptée à l'extraction des plasmides de petites et de grandes tailles (>100 Kb). Elle met à profit les propriétés structurales de l'ADN plasmidique, qui est libérée après la lyse des bactéries sous des conditions qui dénaturent l'ADN chromosomique par traitement à la chaleur et un détergent anionique.

L'ADN chromosomique, les protéines et les débris cellulaires sont éliminés par action du phénol/ chloroforme/ alcool-isoamylique. L'ADN plasmidique se retrouve dans la phase aqueuse ou « l'extrait brut » non précipité est analysé immédiatement sur gel d'agarose.

Technique

- ❖ Inoculer une colonie bactérienne dans 5ml de milieu LB additionnés de l'antibiotique approprié.
- ❖ Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
- ❖ Centrifuger 1.5 ml de la culture bactérienne à 15.000 trs/min. pendant 2min.
- ❖ Resuspendre le culot bactérien dans 50µl de la solution 1.
- ❖ Ajouter 100µl de la solution 2, mélanger délicatement en inversant le microtube plusieurs fois.
- ❖ Mettre le microtube dans un bain-marie à 65°C pendant 10min.
- ❖ Placer immédiatement le microtube dans la glace pendant 5 min.
- ❖ Rajouter un volume de phénol/ chloroforme/ isoamyl-alcool et mélanger délicatement.
- ❖ Centrifuger le mélange pendant 10mn. à 15.000 trs /mn.
- ❖ Laisser reposer le microtube pendant 5mn.
- ❖ Récupérer 35 à 70 µl de la phase aqueuse et la mettre dans un nouveau microtube.
- ❖ Ajouter 10 à 20µl de solution de dépôt, puis déposer l'échantillon immédiatement sur le gel d'agarose.

Solutions employées :

Solution 1 : TE Tris 50mM pH 8.0
 EDTA-Na₂ 1M

Solution 2 : Tris – SDS Tris 50 mM pH 12.6
 Sodium Dodécyl sulfate (SDS) 3%

Phénol/ chloroforme/isoamyl-alcool (25 :24 :1)

ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les acides nucléiques peuvent être séparés sur gel d'agarose dans un but analytique ou préparatif (Kamoun, 1997 ; Kaplan-Delpech, 1998).

Principe

C'est une technique standardisée qui assure la séparation, l'identification et la purification de fragments d'ADN chargés négativement. La visualisation de ces derniers sur gel se fait à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium (0.5µg/ml) ; ce dernier est un agent fluorescent qui est fluorescent aux UV.

La migration de l'ADN dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique dépend de plusieurs paramètres :

- ❖ Le poids moléculaire de l'ADN.
- ❖ La concentration d'agarose dans le gel.
- ❖ La conformation de l'ADN.
- ❖ Le voltage appliqué.
- ❖ La composition du tampon d'électrophorèse (SAMBROOK et al, 1989).

Technique

Préparation du gel

- ❖ Placer un peigne dans le moule de la cuve d'électrophorèse, afin de réaliser des logettes dans le gel.
- ❖ Faire dissoudre l'agarose (0.7%) dans le tampon TBE 10X (dilué au 1/10) par chauffage jusqu'à ébullition.
- ❖ Laisser refroidir jusqu'à 50°C et ajouter le Bromure d'Ethidium à une concentration finale de 0.5µg/ml.
- ❖ Couler l'agarose dans la plaque d'électrophorèse sur une épaisseur de 0.5-1cm et laisser se solidifier.
- ❖ Retirer le peigne sans abîmer les logettes.
- ❖ Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE 1X de façon à CE que le gel soit immergé par le tampon.

Préparation des échantillons à analyser

Mélanger 20µl de la préparation plasmidique avec 5µl de solution de dépôt 5X contenant un témoin de migration (le bleu de bromophénol) et du glycérol pour alourdir l'échantillon.

Dépôt et migration électrophorétique

- ❖ Déposer les échantillons à analyser dans les logettes du gel.
- ❖ Réaliser l'électrophorèse sous 90V pendant six heures.

Visualisation de l'ADN plasmidique

Elle se fait sous UV à 254 nm sur transilluminateur

Solutions employées

Tampon TBE 10X : Tris 89Mm
Acide borique 89 mM
EDTA – Na₂ 2.5 Mm

Solution de dépôt : Glycérol 50% (W/V)
Tris – HCl 50mM pH 7.5
EDTA- Na₂ 5mM
Bleu de bromophénol 0.05% (Watt/Voli)
Rnase 30µg /ml

Bromure d'éthidium (BET) : 10mg/ml d'H₂O

II.8 Transfert des plasmides par conjugaison

La conjugaison représente le phénomène de contact physique par lequel les plasmides peuvent passer d'une cellule donatrice (D) à une autre réceptrice (R). (Haas et Riess 1983)

Pour pouvoir détecter le passage du plasmide d'une souche à une autre, il faut que leurs phénotypes diffèrent. Pour obtenir les meilleurs résultats, plusieurs expériences ont été effectuées avec les différents rapports de donneur et receveur (D/R) pendant des temps de contacts différents. Le contact a été effectué dans le milieu liquide de Mueller Hinton. (Joly et al., 1975, Reimann et Haas, 1986).

Le croisement est effectué entre cinq souches multirésistantes présentant une sensibilité à la rifampicine et une souche d'*E. coli* K₁₂ caractérisée par sa sensibilité à toutes les molécules d'antibiotiques à l'exception de l'acide nalidixique et de la rifampicine

Technique

Les souches donatrices et réceptrices d'une culture fraîche en fin de phase logarithmique (5×10^8 cellules / ml) ont été mélangées dans un rapport de D/R : 1/1, 1/5, 1/10 et 10/1 pour la conjugaison sur le milieu liquide. L'incubation a été faite pendant des temps de 10 min, 40 min, 1h, 2h, 4h à 16h.

A partir du mélange donatrice-réceptrice, 3 dilutions à 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} sont préparées.

La sélection a été faite sur Mac Conkey (18 ml) additionnés, en surfusion, de 1ml de la solution de rifampicine et de 1ml de la solution d'antibiotique qui contresélectionne les transconjugants :

- Rifampicine 100 µg/ml.
- Ampicilline 40 µg/ml.
- Amoxicilline 40 µg/ml.
- Imipénème 12,5 µg/ml.

L'ensemencement a été effectué selon le schéma ci-dessous (Figure 14) et l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

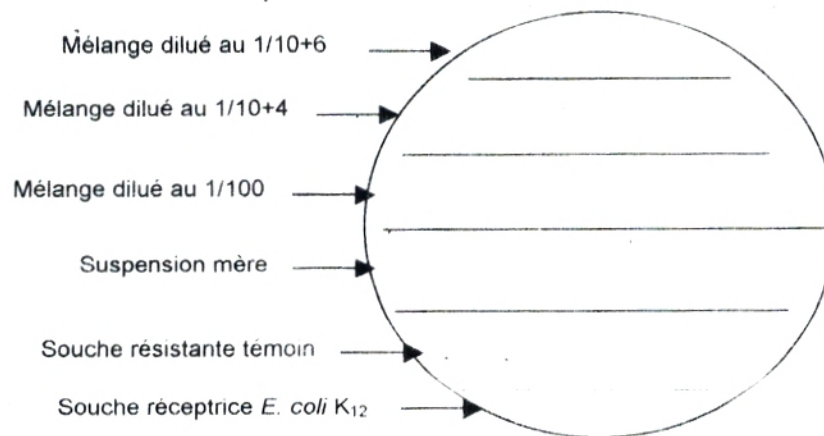


Figure. 14 : Ensemencement sur boîte de sélection

Lecture

Sur les boîtes de sélection, la souche donatrice et la souche réceptrice ne doivent pas se développer ; seules les bactéries résistantes à la fois à la rifampicine et à l'antibiotique de sélection sont capables d'y croître.

Quelques colonies des transconjugants sont repiquées du milieu sélectif et analysées du point de vue de leur acquisition de nouveaux caractères de résistance et de transfert de plasmide.

II.9. Curage effectué par des substances chimiques

Principe

Le principe consiste à cultiver une souche possédant le plasmide en présence d'une substance curante qui provoquera une perte de plasmide supérieure à la perte spontanée chez une population de bactéries. (Bouanchaud et Chabbert, 1971)

Technique

1^{er} jour

- Préparation des dilutions :

Faire une série de dilutions de l'agent curant à des concentrations croissantes allant de 20 µg/ml jusqu'à 2048 µg/ml en milieu BHIB sous un volume de 4 ml.

- Prévoir un tube de contrôle sans agent curant.
- Inoculer la gamme et le tube témoin avec 0,1 ml d'une dilution 10^{-5} d'une culture de 18 h de la souche à étudier.
- Incuber 18 h à 37°C à l'obscurité (afin d'éviter les phénomènes de photoréactivation qui conduisent à la réparation de l'ADN et à la survie du plasmide).

2^{ème} jour

- Déterminer la concentration minimale inhibitrice de la souche vis à vis du produit utilisé.
- Isoler sur gélose MH, les bactéries du tube immédiatement inférieur à celui de la CMI ainsi que celle du tube témoin par inondation de la surface des boîtes avec des dilutions appropriées de manière à obtenir 200 à 300 colonies par boîtes.
- Sécher les boîtes ouvertes 30 minutes à l'étuve et incuber à 37°C pendant 18 h.

3^{ème} jour :

Réaliser un antibiogramme sur les colonies qui ont poussé afin de déterminer la perte de caractères de résistance.

RÉSULTATS
&
DISCUSSION



I. IDENTIFICATION

Cent souches se sont avérées des bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies strictes, oxydase positive, dégradant le glucose par voie oxydative, lactose négatif ; elles peuvent donc être assignées au genre *Pseudomonas*.

Les caractères cultureux et biochimiques (galerie classique, API 20E et Galerie Pasteur *Pseudomonas*) rapportés dans les tableaux 6,7,8 augurent de l'appartenance de ces souches à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (figure 15,16,17)

Sur la base de l'auxanogramme , la galerie API 20 E a permis de mettre en évidence 4 biotypes (Tableau 7).

Tableau 6 : Caractères principaux d'identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* par galerie classique

Souches	Croissance à 42°C	Métabolisme du glucose	Production de pigment pyocyanique	Production de la pyoverdine	Oxydase	Type respiratoire	Citrate de simmons	Mannitol mobilité
F ₁₃₄ - R ₃₇ - R ₁ - F ₁ - K ₇ S ₁	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
- 2' S ₂ - 3B - K ₂ I ₂	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
S ₁₀ - P ₁₀₃ - S ₇ - S ₁₉ - Ft- P ₄₅ - S ₁₁ P ₄₃ - E ₁ - O ₁ * - A ₁ O ₃ *- C _{vo} -	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
A ₁₅ - z ₅ - 80u - 9070- P ₈ - P ₄ . RAM - F ₂ - F ₁₀ - A ₁₃ - 5SB- O38- 2'S ₁ - 2'S ₃ - 40- P ₂₉ - P ₃₈ - SS- X ₅ - MA ₁ - K ₁ - P ₄₈ - P ₀₃ -	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
P69. E* - P ₀₂ - A ₁₆ - M _{A3} - F ₉ - V ₁ - V ₃ - V ₄ - V ₅ - 1SB- 2SB- 3SB- 4SB- OP ₂ - OS ₁₄ - 053- F ₈ - F ₇ - F ₉ - F ₅ - P ₈₆ S ₁ - S ₈ S ₁ - 43- 068- SAU- K ₁₃ S ₃ - Pa -	+	Inerte	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
5 - 16* - z ₁₁ - P ₄₁ - F ₃ - P ₈₆ S ₃ - P ₄₂ - S ₁₀ S ₁ - y(f)- 065- P ₀₁ - 2wii- 012' -Po PM- Po ₈₁₈ - 2'- S ₈ -	+	Oxydatif	+	+	+	Aérobie stricte	+	+
062- S ₁₀ S ₂ - 15*- M37 - D74 - P ₇₇ - F ₁₁ - S ₂₅ - 2d ₃ - SW - V ₂	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+
	+	Inerte	-	+	+	Aérobie stricte	+	+

Tableau 7 : Résultats de l'identification par système API 20 E

Code	Test	ON PG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Biotypes	(%)		
S ₁₀ -P ₁₀₃ - S ₇ - S ₁₉ - F ₁ -P ₄₅ - S ₁₁ P ₄₃ - E ₁ - O ₁ *- A ₁ -O ₉ *- C ₁₁₀ - A ₁₅ - Z ₅ -S ₀₀ - 9070 -P ₈ - P ₄ - RAM -F ₂ - F ₁₀ -A ₁₃ -5SB - O ₃₈ - 2'S ₁ -2'S ₃ -40-P ₂₉ -P ₃₈ -SS-X ₅ - MA ₁ -K ₁ -P ₄₈ -PO ₃ - - 5 -16*- Z11- P41-F ₃ -PS ₆ S ₃ - P ₄₂ - S ₁₀ S ₁ - Y(F)- O65-PM- 2W11- O ₁₂ -PO ₅ - PO ₁ -POS ₁₈ -2'-S ₃	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2216004	53		
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			+	
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			-	+
P ₆₉ -E*-Po ₂ -A ₁₅ -MA ₃ -F ₉ -V ₁ -V ₂ - V ₃ -V ₄ -V ₅ -1SB-2SB-3SB-4SB- OP ₂ -OS ₁₄ -O ₅₃ -F ₈ -F ₇ -F ₆ -F ₅ - PS ₆ S ₁ -S ₈ S ₁ -43-SW-2d ₃ -O ₃₈ - SAU-K ₁₃ S ₃ -Pa- M ₃₇ -D ₇₄ -P ₇	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2212004	34	
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+			
F ₁₃₄ -R ₃ -R ₁ -F ₁ -K ₇ -S ₁ -2'S ₂ -3B- K ₂ B ₂	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2216006	5	
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+			
S ₂₅ -O ₆₂ -S ₁₀ S ₂ -F ₁₁ -15*	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2212006	5	
	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+			

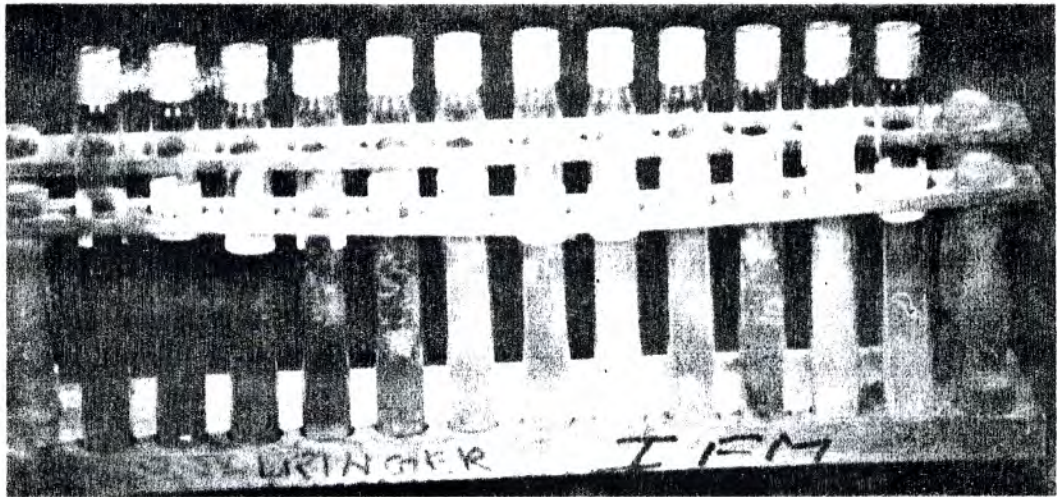


Figure 15 : Illustration de la production de pigments chez quelques souches de *Pseudomonas aeruginosa*

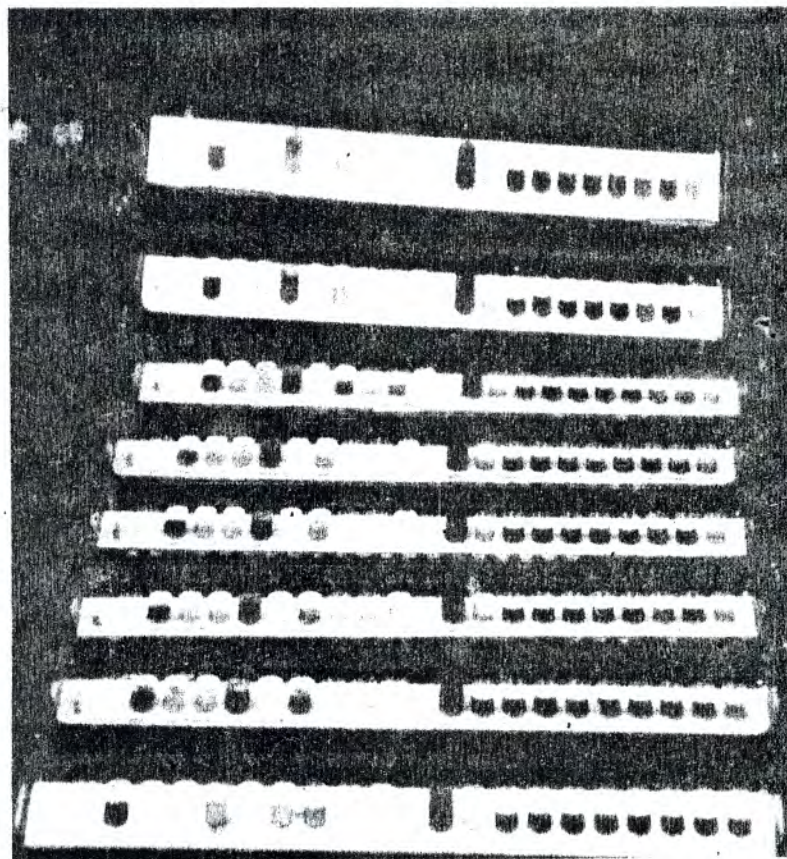


Figure 16 : Illustration de l'identification par galerie API 20 E pour quelques souches de *Pseudomonas aeruginosa*

II. PREVALENCE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN FONCTION DU TYPE DE PRELEVEMENT

Les résultats regroupés dans le tableau 9 montrent que les 100 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir d'un total de 197 prélèvements, soit 50,7%, et la majorité des souches est issue du pus (73%). Les urines et l'environnement se partagent le reste de façon presque égale, respectivement 16% et 14%.

Ces données montrent d'abord l'importance de l'implication de *Pseudomonas* dans les infections hospitalières en général, notamment dans les services de chirurgie, et à l'hôpital de Tlemcen en particulier.

En effet, il est connu que *Pseudomonas aeruginosa* est un germe préférentiellement hospitalier (Bahal et Kezzal, 1983 ; Blanc et al., 1997 ; Larabi et al., 2001), sévissant particulièrement dans les services de chirurgie et de soins intensifs (Widmer et al., 1993 ; Juma et Chattopadhy, 1994 ; Cailleaux et al., 1997). Ces services sont à haut risque en raison des pathologies qui sont recrutées et des contaminations liées au matériel utilisé : Cathéter, sonde, canule de trachéotomie, matériel de chirurgie.

Concernant la fréquence importante (50,7%) de *Pseudomonas aeruginosa* dans les surinfections à l'hôpital de Tlemcen, celle-ci est en accord avec la moyenne nationale de 50% rapportée dans le rapport d'évaluation de la surveillance de la résistance aux antibiotiques du Ministère de la Santé (2000). Ce taux national d'implication de *Pseudomonas* dans les infections est nettement plus élevé par rapport à ce qui est signalé dans les autres pays tels que les USA (9%) (Emori et Gaynes, 1993) et la France (8,7%) (Bert et Lambert Zechovsky., 1999). Ceci peut être dû à la mauvaise prise en charge du malade dans le contexte de l'hygiène hospitalier avec tout ce que cela implique comme insuffisances au niveau du personnel soignant, linges - literie, locaux, matériel médical....

Sur les plans tropisme et physiopathologie, *P.aeruginosa* a une prédilection pour les plaies et le tractus urinaire suite à l'utilisation de cathéter (Griffith et al., 1989).

Les fréquences d'isolement de *P. aeruginosa* retrouvées en fonction du type de prélèvement concordent avec celles rapportées, au niveau national, par Rahal et Kezzal (1983) (pus : 49,6% ; urines : 9%) et dans le rapport d'évaluation de la résistance aux antibiotiques du Ministère de la Santé (2000) où il est indiqué que la plupart des souches de *P.aeruginosa* ont été isolées chez les malades hospitalisés et à partir de suppurations ; tandis qu'au niveau international, les taux sont plus faibles et varient selon les pays, les hôpitaux, et les services(Philipon, 1998 ; Bert et Lambert Zechovsky., 1999 ;Larabi et al., 2001).

La recherche d'une réserve environnementale de *Pseudomonas aeruginosa* a permis de mettre en évidence ce dernier à un taux de 14%, principalement au niveau des points d'eau (robinet, siphon) ; cette présence est en rapport avec l'affinité hydrique de *Pseudomonas* et constitue un risque potentiel d'infections endémiques ou épidémiques (Ferroni et al., 1998). Les travaux de Blanc et al (1997) sur l'environnement hospitalier ont révélé la présence de *P.aeruginosa* une fréquence de 9%.

Tableau 9 : Origine et nature des prélèvements

Lieu de prélèvement	Nature du prélèvement	Maladies	Nombre de prélèvements	Nombre de souches isolées
CHIRURGIE	Pus – sang	Cholécystite aiguë	120	88 (73%)
		Abcès de la fesse		
		Appendicectomie		
		Lésion rectale		
		Néo vésiculaire		
		Occlusion intestinale		
		Fibrome		
		Kyste hydatique		
		Eventration		
	Plaies			
Urines	Infections urinaires	42	7 (16%)	
Environnement		35	5 (14%)	

III.SEROTYPAGE

Le sérotypage des souches a révélé une diversité illustrée par la présence de 15 sérotypes sur les 16 recherchés, l'exception étant l'absence de O13.

Le sérotype n'étant pas connu comme ayant une relation directe avec la virulence, sa détermination dans le cadre hospitalier a surtout une valeur de marqueur épidémiologique.

D'une façon globale, on a noté une fréquence relativement élevée de O11, tandis que celle des autres sérotypes ne présente pas de fluctuation significative (Tableau 10)

Ces données dénotent d'une absence de caractère épidémique dans les infections. Par ailleurs, il faut noter quand même la singularisation du sérotype O11 avec son taux de 14%.

Les sérotypes retrouvés dans notre étude ne concordent pas entièrement avec ceux rapportés par Rahal et Kezzal (1983) pour l'Ouest du pays. En effet, ces auteurs ont placé O6 largement en tête, tandis que le O11 ainsi que les O9 et O4 n'ont pas été retrouvés dans la région d'Oran. Ceci est peut-être en relation avec une évolution épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa* : apparition de nouveaux sérotypes et circulation des souches.

A l'étranger, les sérotypes prédominants varient selon les pays ; Watine et al. (1995) ont effectué un sérotypage, sur 4 ans, de tous les *Pseudomonas aeruginosa* isolées à l'hôpital de Rodez (France), il en est ressorti la prééminence des sérotypes O11 et O12.

IV. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Toutes les souches ont été testées vis à vis de 31 molécules d'antibiotiques appartenant à 8 familles différentes, dont 13 β -lactamines. Les résultats, illustrés par les figures 18,19 et tableau 11, ont fait ressortir que l'ensemble des souches présentait une résistance à la majorité des antibiotiques.

Tableau 11: Pourcentage de souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux antibiotiques

Antibiotique	Pourcentage de résistance
Ampicilline	100
Amoxicilline-Acide clavulanique	100
Ticarcilline	68
Pipéracilline	40
Oxacilline	100
Céfalotine	91
Céfazoline	96
Céfoxitine	87
Céfotaxime	62
Céfopérazone	49
Céfsulodine	45
Céftazidime	37
Impénème	6
Néomycine	84
Kanamycine	98
Tobramycine	37
Amikacine	36
Gentamicine	53
Doxycilline	100
Lincomycine	100
Colistine	63
Rifampicine	91
Fosfomycine	95
Tétracycline	96
Acide pipémidique	48
Triméthoprime	97
Furane	98
Néthilmicine	70
Pefloxacine	60
Acide Oxolinique	74
Sulfamide+triméthoprime	99

4.1. Bêta-lactamines

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une résistance à de nombreuses bêta-lactamines. Un taux de résistance de 100% a été constaté pour les aminopénicillines (AM, AMC) et l'Oxacilline (Péni M) ; l'activité des carboxypénicillines (ticarcilline) a été faible avec 68% de souches résistantes ; les uréidopénicillines (pipéracilline) ont eu une efficacité moyenne avec 40% de résistance.

L'activité des céphalosporines de première génération s'est avérée très faible, les pourcentages de résistance aux céfalotine et céfazoline sont respectivement de 91% et 96%, de même que la céfoxitine (céphalosporine de 2^{ème} génération) avec un taux de 87%.

Certaines céphalosporines de 3^{ème} génération ont présenté une efficacité moyenne, c'est le cas de la céfsulodine (45%) et la céftazidime (37%), ainsi que le céfopérazone (49%), à un moindre degré. Tandis que le céfotaxime est resté inactif sur 62% des souches.

Une sensibilité importante a été observée pour l'imipénème avec un pourcentage de résistance de 6%.

L'association de l'acide clavulanique avec l'amoxicilline n'a pas eu d'influence sur l'activité de cette dernière.

Les résultats observés pour la ticarcilline et la pipéracilline sont nettement plus élevés que ceux rapportés par le rapport de surveillance de la résistance aux antibiotiques du Ministère de la Santé (2000) avec respectivement 25.7% et 21% ; ainsi que ceux signalés par des études récentes en France (33-42% pour la ticarcilline et 23-29% pour la pipéracilline) (Bert et Lambert-Zechovsky, 1999), en Tunisie (TIC : 46.2%) (Larabi et al., 2001), en Grande Bretagne (TIC : 12%), (Chen et al., 1995). Tandis qu'en Italie, le taux de résistance à la pipéracilline de 45% correspond relativement à notre résultat.

X L'activité modérée de la pipéracilline et de la ticarcilline ne pourrait s'expliquer que par une pression de sélection indirecte ; en effet, la première molécule a été introduite récemment en thérapeutique et la seconde n'est pas utilisée en Algérie.

En raison d'une membrane externe peu perméable, une production de céphalosporinase chromosomique inductible et une faible affinité pour les PLP, le bacille pyocyanique présente une résistance naturelle aux pénicillines, notamment aux aminopénicillines et pénicillines M (OXA) et aux céphalosporines les plus anciennes (Cavallo, 1997). X

La résistance à la ticarcilline et pipéracilline est de type acquise plasmidique avec comme principal mécanisme l'inactivation enzymatique de l'antibiotique. Ainsi la synthèse de bêta-lactamases à large spectre de type CARB (PSE-1, PSE-4 par exemple) entraîne un niveau de résistance à ces deux molécules (Philippon, 1998 ; Bert et Lambert-zechovsky, 1999).

D'autres enzymes responsables de l'inactivation consécutive des pénicillines anti-*Pseudomonas* (TIC et PIP) ont été décrites ; il s'agit :

- Des bêta-lactamases dérivées par mutation (TEM-42, SHV-2) (Bert et al., 1998 ; GERPB, 1998).
- La bêta-lactamase PER-1 (GERPB, 1998).
- Les bêta-lactamases OXA ayant évoluées par mutation (OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-18...) (Chen et al., 1995 ; Karlowsky et al., 1997).

L'inefficacité du céfotaxime sur les *Pseudomonas* est liée au fait que cette molécule n'est pas naturellement active contre ce germe. Malgré la sensibilité observée parfois *in-vitro* ; en clinique, la réponse de l'antibiogramme doit être notée comme résistance, puisque *in-vivo*, celle-ci est très vite acquise.

Les taux de résistance aux céphalosporines considérées comme anti-*Pseudomonas* (céftazidime, céfsulodine, céfopérazone) retrouvés dans notre étude sont importants comparativement à la moyenne nationale (10,3%) (Ministère de la Santé, 2000) et à ce qui est signalé dans d'autres pays, notamment la France avec des taux de 16-20% pour la céftazidime (GERPB, 1995 et 1998).

Notre résultat de 6% relatif à la résistance à l'imipénème, molécule réputée pour son action anti-pyocyanique, est supérieur au taux moyen national de 2% divulgué dans le rapport de surveillance du Ministère de la Santé (2000). Tandis qu'il est inférieur à la majorité des taux de résistance décrit à l'étranger, comme le Japon (10%) (Philippon, 1998), la France (16-20%) (GERPB, 1995 ; Bert et Lambert-zechovsky, 1999) ; à l'exception de la Grande Bretagne (2.5%).

Outre les bêta-lactamases précédemment décrites, les autres mécanismes les plus importants sous-jacents la résistance aux céphalosporines anti-*Pseudomonas* est l'hyperproduction de céphalosporinases et la synthèse d'une imipénémase (IMP-1). Cette dernière qui confère principalement la résistance acquise à l'imipénème a été initialement identifiée au Japon et le phénotype de résistance inclut aussi les pénicillines, la céftazidime, la céfsulodine ou encore le céfpirome.

Il est à noter l'importance des niveaux de résistance sur les plans qualitatif et quantitatif atteinte à l'hôpital de Tlemcen. Ces résistances, qui sont la résultante de mécanismes génétiques, biochimiques et sélectifs complexes, dénotent d'une réelle situation de déséquilibre dans l'emploi des antibiotiques : indication, posologie, observance et diversification des molécules.

4.2. Les autres antibiotiques

4.2.1. Aminosides

Le bacille pyocyanique est resté relativement sensible à certains aminosides, on a noté 36 % de souches résistantes à l'amikacine, 37 % à la tobramycine et 53% à la gentamycine.

La résistance a été plus importante vis à vis de la nétilmicine, la néomycine et la kanamycine pour lesquels les taux retrouvés sont respectivement de 70 %, 84 % et 98 %. Ces taux ont été souvent plus élevés que ceux de la moyenne nationale (amikacine :5%, gentamycine :22,7%, tobramycine :9%) publiés par le Ministère de la Santé (2000) et de ceux signalés par la littérature ; ainsi en France, selon Soussy (1997), 47 % des souches ont résisté à la gentamicine et la nétilmicine, 28 % pour la tobramycine et 11 % pour l'amikacine.

Comme pour les bêta-lactamines , l'incidence de la résistance est extrêmement variable selon les pays et les services, de 9 à 30% par exemple selon les études pour l'amikacine (GERPB ,1995 ; Bert et Lambert-Zechovsky, 1997). D'une façon globale, diverses enquêtes ont permis de préciser dans divers pays ou continents les fréquences de résistance aux aminoglycosides qui varient de 10% à 60%, en général plus importantes pour la gentamycine que l'amikacine.

Les mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* sont devenus d'une extrême complexité et leurs survenus va en augmentant. Le niveau de résistance était de 37 % en 1993, alors qu'il n'était que de 15 %, une dizaine d'année plutôt. Le mécanisme le plus fréquent est la modification de la pénétration transpariétale, puis l'inactivation par les enzymes de type AAC(6)-II et ANT (2")-I suivi de l'association de plusieurs mécanismes enzymatiques (Miller,1994).

À côté de la résistance enzymatique, *Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance de nature non enzymatique (impermeabilité) : il s'agit d'une perturbation d'un système de transport actif de l'antibiotique d'où une diminution de son accumulation à l'intérieur de la bactérie. Elle se traduit par une résistance de bas niveau à l'ensemble des aminosides.

4.2.2. Quinolones

Concernant les quinolones classiques, nos souches ont présenté une résistance de 48 % vis à vis de l'acide pipémidique et 74 % vis à vis de l'acide oxolinique. Il faut noter le taux de résistance de 60% à une fluoroquinolone, la péfloxacin.

En Algérie, les données du Ministère de la Santé en 2000 situent la résistance à la péfloxacin au taux de 24%, de même que le travail de Larabi (2001) en Tunisie avec un taux de 21,5%. En France, le constat est que la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux fluoroquinolones a progressé très rapidement au cours de ces dernières années, son incidence était de 34 % en moyenne en 1995, pouvant atteindre 58 % dans certains hôpitaux. (GERPB, 1995 ; Soussy, 1997 ; Bert et Lambert-Zechovsky, 1999).

Pseudomonas aeruginosa est naturellement résistant aux quinolones classiques, tandis que la résistance acquise aux nouvelles quinolones fait intervenir les mécanismes suivants :

- Modification de l'affinité de plusieurs enzymes (Gyr A- Gyr B - Par C).
- Impermeabilité en relation avec les porines ou la composition du LPS.
- Hyperproduction de divers systèmes d'efflux.

Les trois systèmes d'efflux pour les bêta-lactamines confèrent une résistance de bas niveau aux quinolones. Ainsi, de faibles concentrations d'une quinolone ou même associée à une bêta-lactamine peuvent sélectionner *in-vitro* des mutants résistants à ces deux familles d'antibiotiques. L'émergence de résistance aux bêta-lactamines peut aussi survenir *in-vivo* à la suite d'un traitement par les fluoroquinolones (Aubert et al., 1992 ; Masuda et al., 1992 et 1996).

4.2.3. Polymyxines

La colistine n'a pas été active sur 63 % des souches. Même quand elles sont actives, les polymyxines donnent des résultats cliniques décevants (Soussy, 1997).

4.2.4. Tétracyclines

Bien que non utilisée dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, la tétracycline et la doxycycline ont été testées dans le but de compléter l'antibiotype de nos souches. Ces dernières ont présenté des taux de résistance de 96% pour TE et 100% pour DO

4.2.5. La fosfomycine

Elle fait partie des produits susceptibles d'être utilisés en clinique dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons enregistré un taux de résistance de 95%. Ce résultat est supérieur aux taux de résistance de 70% rapportée par Soussy (1997) et par Arlet et Lambert-zechovsky (1999).

Ces résistances sont chromosomiques et liées à des mutations probables affectant les mécanismes de transport actif. L'émergence rapide de mutants résistants impose toujours d'utiliser cet antibiotique en association avec d'autre (Philippon, 1998).

4.2.6. La rifampicine

La rifampicine a été inactive sur nos souches puisque 91% en sont arrivées à résister à cette molécule. Cette résistance peut être expliquée par une mauvaise pénétration transpériéale de la rifampicine (Bryskier, 1999).

4.2.7. Furanes

Le taux de résistance de nos souches vis-à-vis des furanes a été de l'ordre de 98% ; cette résistance totale peut être due à l'imperméabilité membranaire, mais surtout à un déficit fonctionnel de la nitrofurane réductase d'origine chromosomique ou plasmidique (Bryskier, 1999).

4.2.8. L'association Triméthoprim-Sulfamides

Cette association est totalement inactive sur nos souches qui peut être expliquée par une résistance naturelle de *P. aeruginosa* (Bryskier, 1999).

Sur le plan de la multirésistance (Tableau 12 et Figure 20 et 21), les souches testées ont montré des profils englobant :

- Six à treize phénotypes de résistance en ce qui concerne les bêta-lactamines, déterminant un ensemble de 55 antibiotypes différents.
- Dix sept à trente et un phénotypes de résistance par rapport à l'ensemble des antibiotiques testés, permettant de distinguer 100 antibiotypes différents.

χ L'utilisation extensive des antibiotiques et parfois abusive, leur prescription inopportune relative à l'indication ou la posologie, les conditions particulières du milieu hospitalier (promiscuité, hygiène, médication) ont favorisé l'émergence d'une résistance bactérienne alarmante et sa diffusion large intra-espèce et même inter-générique. A la base de ce phénomène, on assiste à l'apparition, suite à des réarrangements génétiques simples, de nouveaux mécanismes de résistance à spectre élargi et à leur multiplicité. Ceci a conduit à une éruption de la multirésistance et *Pseudomonas aeruginosa* en constitue un exemple édifiant. χ

Dans ce sens, on peut citer quelques multirésistance suivante :

- Résistance simultanée à : céftazidime, céfepime, céfsulodine, azlocilline, pipéracilline, imipénème, méropénème, aztréonam, amikacine, tobramycine, gentamycine, ciprofloxacine et ofloxacine (Panzig et al., 1999)
- Résistance simultanée à : ampicilline, mézlocilline, céfopérazone, céftazidime, céftriaxone, céfotaxime, aztréonam, pipéracilline, ticarcilline (Khurana et al., 1994).
- Résistance simultanée à : pipéracilline, ticarcilline, céftazidime, céfepime, imipénème, méropénème, gentamycine, tobramycine, ciprofloxacine (Mazzariol et al., 1999).
- Résistance simultanée à : ticarcilline, imipénème, amikacine, gentamycine, nétilmicine, ciprofloxacine, céftazidime, aztréonam, rifampicine (Salauze et al., 1997).

Tableau 12 : Caractéristiques des souches isolées

Codes	AM	AMC	TC	PpP	OX	CF	CZ	FOX	CTX	CFP	CFS	CAZ	N	K	TM	AN	GM	DO	L	CS	RA	FOS	TE	PI	TMP	FT	NET	PEF	OA	SXI	IPM	Biotype	Séro type	
PS ₆ S ₃	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	I	S	I	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	2216004	Poly	
P ₄₂	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	I	R	R	S	S	I	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	2216004	Poly	
S ₁₀ S ₂	R	R	I	I	R	I	R	S	R	I	R	R	I	R	I	S	I	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	2212006	Poly		
S ₁₀ S ₁	R	R	R	I	R	S	R	S	R	I	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	2216004	Poly	
K ₇ S ₁	R	R	I	I	R	S	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	I	S	R	S	2216006	Poly	
PS ₁ S ₆	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	R	I	2212004	Poly	
2'S ₁	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	2216004	O ₁₁	
2'S ₂	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	S	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	I	2216006	Non	
2'S ₃	R	R	I	S	R	R	R	R	I	I	R	S	R	R	I	S	S	R	R	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	S	2216004	Poly	
S ₈ S ₁	R	R	S	R	R	S	R	S	R	I	R	I	I	R	S	S	I	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	S	2212004	Poly	
40	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R	I	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	S	I	I	R	S	2216004	Poly	
43	R	R	R	I	R	S	R	S	R	S	I	I	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R	S	2212004	Poly	
SW	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	O ₂	
3B	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216006	Poly	
2d ₃	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	2212004	O ₁₁	
Y(F)	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	I	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₀	
P ₂₉	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	2216004	Poly	
F ₁₁	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	I	R	S	2212006	Non
O ₆₈	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(S) syn	(S) syn	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	R	S	2212004	O ₁₂
O ₆₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₃	

S : sensibilité, syn : synergie, R : résistance, I : intermédiaire ; Poly : polyagglutination ; Non : non-agglutination

ACQUISITION ET DISCUSSION

Codes	AM	AMC	TiC	PiP	OX	CF	CZ	FOX	CTX	CFP	CFS	CAZ	N	K	TM	AN	GM	DO	L	CS	RA	FOS	TE	PI	TMP	FT	NET	PEF	OA	SXT	IPM	Biotype	Séro type		
PO ₃	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	2216004	Poly		
P ₃₈	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	I	R	S	2216004	O ₃		
SS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	2216004	O ₁		
X ₅	R	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₄	
S ₈	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2216004	O ₄	
(PM)0	(R) syn	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	(S) syn	2216004	O ₁	
MA ₁	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	S	R	R	S	2216004	Poly	
2W ₁₁	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	I	I	R	R	S	2216004	Poly	
SAU	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly
O' ₁₂	R	R	I	S	R	R	R	R	R	I	S	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	2216004	Poly	
PO ₅	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	2216004	Poly	
K-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	2216004	O ₁₀	
K2B2	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	2216006	O ₁₄	
PO' ₁	R	R	I	I	R	R	R	R	I	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	2216004	Non	
15'	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	2212006	O ₄		
PO ₅₁₈	R	R	S	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	S	2216004	Non	
(2')	R	R	(R) syn	S	R	R	R	R	I	S	(S) syn	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	S	2216004	O ₁₁	
P ₄₈	R	R	(S) syn	I	R	R	R	R	S	S	(R) syn	I	I	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	S	2216004	O ₁₁		
(P-7)	R	R	I	I	R	R	R	R	I	I	S	S	I	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	2212004	Non		
(K1 ₃ S ₃)	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	I	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	I	R	R	(R) syn	I	R	R	(S) syn	2212004	O ₁₃		

S : sensibilité, syn : synergie, R : résistance, I : intermédiaire ; Poly : polyagglutination ; Non : non-agglutination.

Résultats et discussion

Codes	AM	AMC	TiC	PIP	OX	CF	CZ	FOX	CTX	CFP	CFS	CAZ	N	K	TM	AN	GM	DO	L	CS	RA	FOS	TE	PI	TMP	FT	NET	PEF	OA	SXT	IPM	Biotype	Séro type		
P ₁₀₃	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	R	S	2216004	O ₁₁		
P ₆₉	R	R	R	R	R	I	I	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	R	R	2212004	O ₁₅		
S ₁₀	R	R	R	S	R	I	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	R	S	2216004	Poly		
S ₇	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	I	R	I	2216004	Poly		
E*	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	O ₉	
S ₁₉	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₆	
F ₁₃₄	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216006	Poly	
F _T	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₄	
S ₂₅	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	(S) syn	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	(S) syn	2212006	O ₉
(P ₄₅)	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(S) syn	R	R	R	R	I	R	(S) syn	2216004	O ₁₁		
S ₁ P ₄₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₂	
(E ₁)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	(S) syn	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	(S) syn	2216004	O ₁₅	
R ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	2216006	O ₆		
O* ₁	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₄		
A ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	2216004	O ₁		
O* ₉	R	R	I	I	R	R	R	I	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	I	R	I	2216004	Poly		
R ₁	R	R	S	I	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	I	R	R	2216006	Poly		
(5 :)	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	I	R	S	2216004	Poly		
C ₁₀	R	R	R	(S) syn	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	(S) syn	2216004	O ₁₁	
(16*)	R	R	R	(S) syn	R	R	R	R	(S) syn	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	I	I	R	I	2216004	Poly		

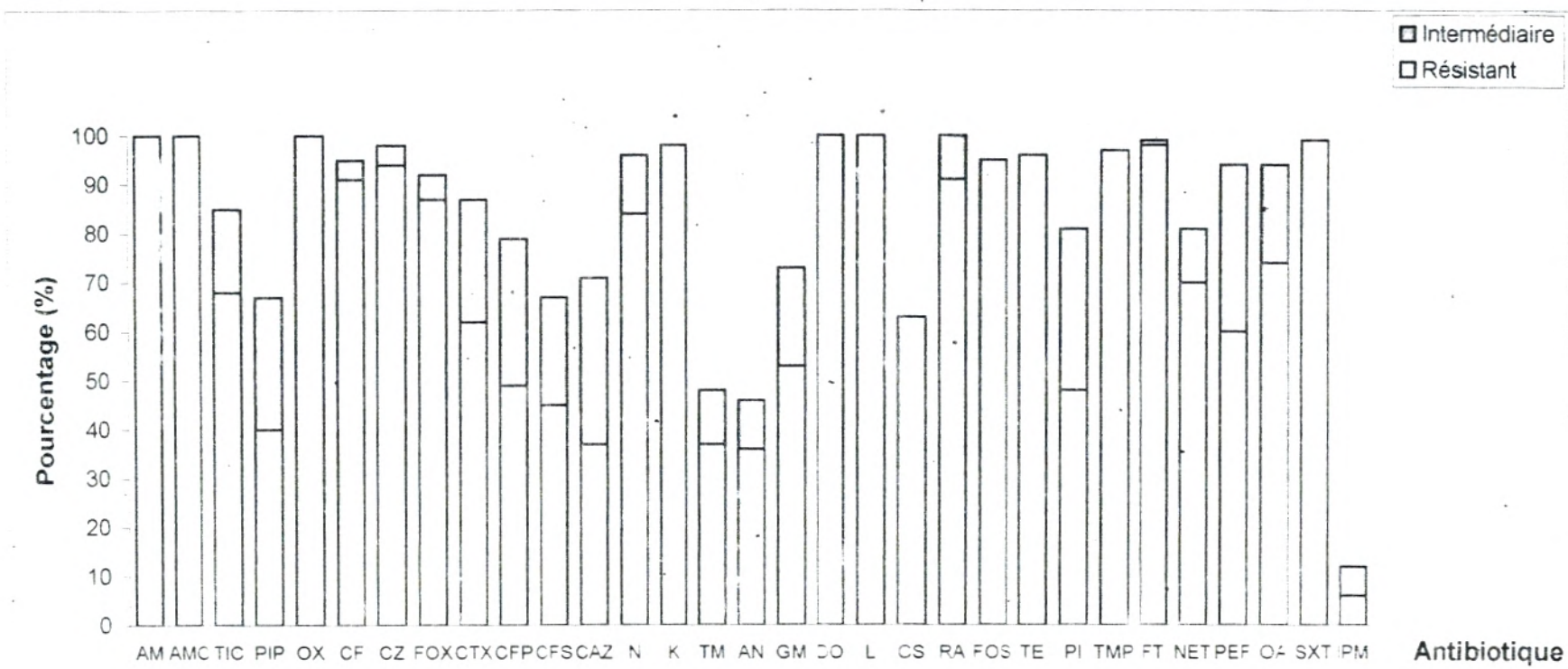
S : sensibilité, syn : synergie, R : résistance, I : intermédiaire ; Poly : polyagglutination ; Non : non-agglutination.

Codes	AM	AMC	TiC	PIP	OX	CF	CZ	FOX	CTX	CFP	CFS	CAZ	N	K	TM	AN	GM	DO	L	CS	RA	FOS	TF	PI	TMP	FT	NET	PEF	OA	SXT	IPM	Biotype	Séro type			
V ₁	R	R	S	I	R	R	R	R	I	I	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly		
V ₂	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	S	2212004	Poly		
V ₃	R	R	R	S	R	R	R	R	I	S	R	I	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2212004	Poly		
V ₄	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	I	I	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly	
V ₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	I	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly	
1SB	R	R	S	I	R	R	R	R	I	I	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly	
2SB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	O ₁₄
3SB	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	S	I	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	O ₅
4SB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2212004	O ₁₆	
5SB	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₂
OP ₂	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2212004	O ₁₁	
OS ₁₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	S	S	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	O ₂
(O ₃₈)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2216004	O ₁₁
O ₅₃	R	R	R	I	R	R	R	R	R	I	I	I	S	R	S	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	2212004	O ₁₁	
O ₆₂	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212006	O ₄
F ₈	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	2212004	O ₇	
F ₇	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	2212004	Non	
F ₆	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	S	2212004	O ₁₁		
(F ₅)	R	R	(R) syn	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R	S	(S) syn	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	2212004	Poly			
PA	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	2212004	poly		

S : sensibilité, syn : synergie, R : résistance, I : intermédiaire ; Poly : polyagglutination ; Non : non-agglutination.

Codes	AM	AMC	TiC	PiP	OX	CF	CZ	FOX	CTX	CFP	CFS	CAZ	N	K	TM	AN	GM	DO	L	CS	RA	FOS	TE	PI	TMP	FT	NET	PEF	OA	SXT	IPM	Biotype	Séro type		
Z ₁₁	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₅	
A ₁₅	R	R	I	S	R	R	R	R	I	I	S	S	R	R	I	I	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	Poly
Z ₅	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	I	S	S	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	2216004	O ₁₁
Soù	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	I	I	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	Poly
P ₄₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₃
9070	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2216004	O ₁₁
P ₈	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	2216004	O ₁₁
PO ₂	R	R	I	S	R	R	R	R	I	I	S	I	R	R	S	S	I	R	R	S	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	R	S	2212004	O ₅	
M ₃₇	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2212004	Poly
A ₁₆	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	2212004	O ₁₂	
P ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	2216004	Poly
D ₇₋₄	R	R	I	S	R	R	R	R	I	S	S	S	R	S	S	I	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	(R) syn	I	R	R	(S) syn	2212004	O ₆		
M _{A3}	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	I	R	R	2212004	O ₁		
(RAM)	R	R	R	S	R	R	R	R	I	I	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	(R) syn	R	R	R	(S) syn	2216004	Poly		
F ₃	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	2216004	O ₁₄	
(F ₂)	R	R	R	S	R	R	R	R	I	I	S	S	I	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	(S) syn	R	R	R	(S) syn	2216004	O ₈		
F ₁	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	2216006	Poly	
(F ₉)	R	R	S	S	R	R	R	R	I	I	S	S	I	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	I	R	R	(S) syn	R	R	R	(S) syn	2212004	O ₁₂		
F ₁₀	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₅
A ₁₃	R	R	I	S	R	R	R	R	R	I	S	I	S	R	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	2216004	O ₁₄

S : sensibilité, syn : synergie, R : résistance, I : intermédiaire ; Poly : polyagglutination ; Non : non-agglutination.



Légende (AM :Ampicilline), (AMC : Ampicilline+Acide clavulanique), (TIC : Ticarcilline), (PIP :Pipéracilline), (OX :Oxacilline), (CZ :Céfazoline), (FOX :Céfoxitine), (CTX :Céfotaxime), (CFS :Céfsulodine), (CAZ :Céftazidime), (IPM :Impipénème), (N :Néomycine), (K :Kanamycine), (TM :Tobramycine), (AM :Amikacine), (GM :Gentamycine), (DO :Doxycilline), (L :Lincomycine), (CS :Colistine), (RA :Rifampicine), (TE :Tétracycline), (PI :Acide pipemidique), (TMP :Trimetoprime), (FI :Furane), (NET :Nétilmicine), (PEF :Pefloxacin), (OA :Acide oxolinique), (SXT :Sulfamide+Trimetoprime).

Figure 18 : Taux de résistance aux antibiotiques chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

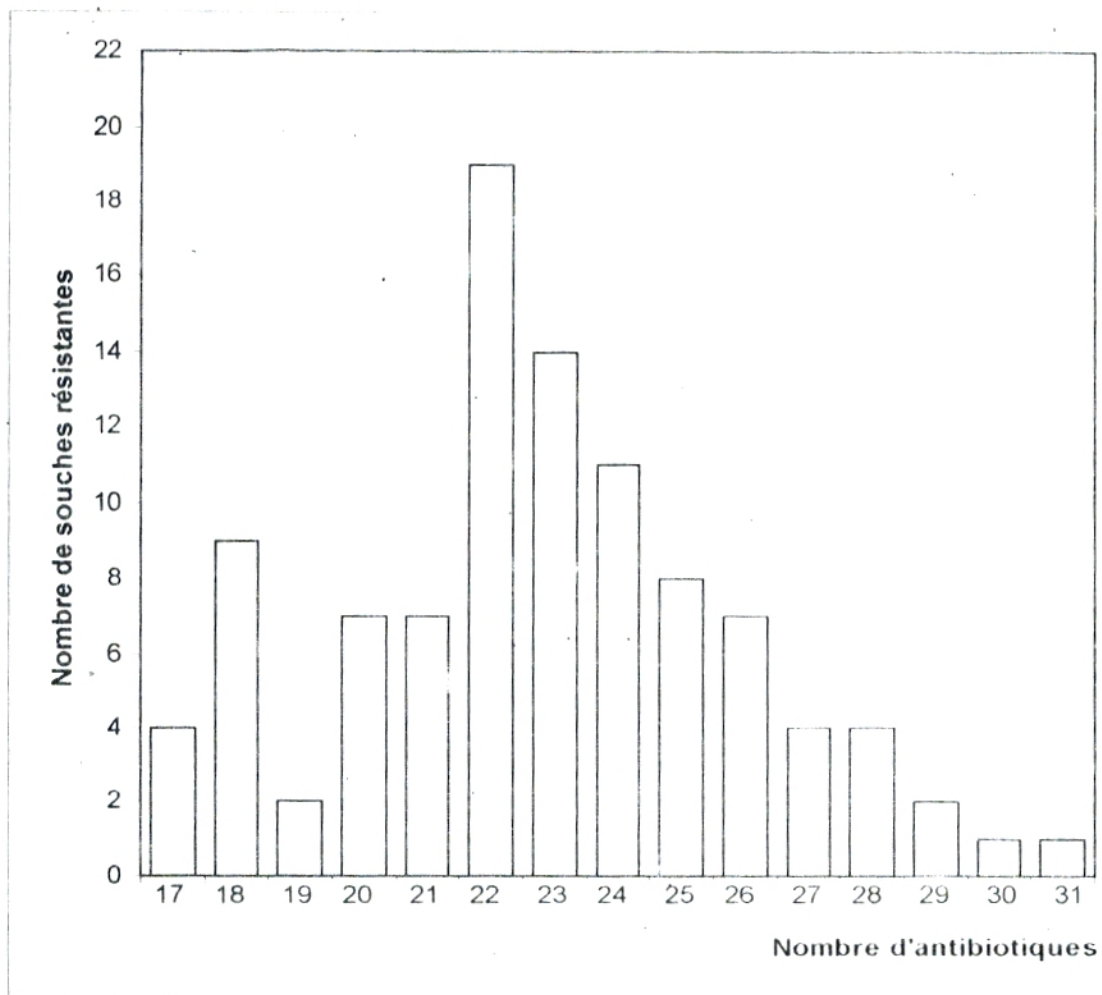


Figure 19: Résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* selon le nombre d'antibiotiques



Figure 20: Résultat de l'antibiogramme de la souche résistante aux antibiotiques suivants : IMP-AM, CZ, TE, FOX, S, TIC

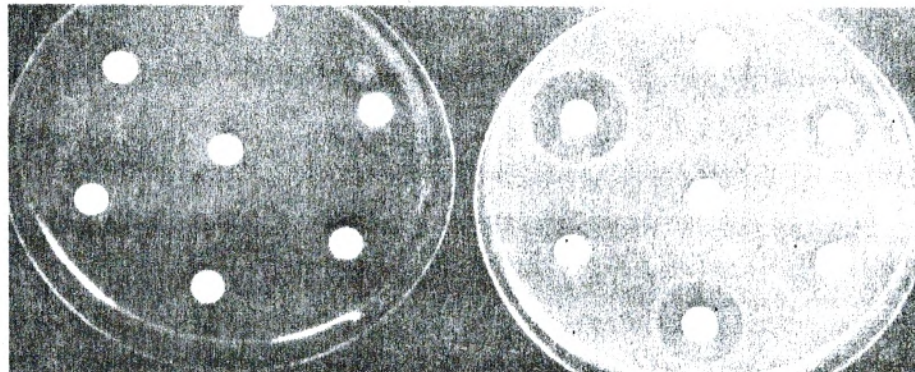


Figure 21: Résultat de l'antibiogramme de la souche résistante aux antibiotiques suivants : FOX, CAZ, TIC, CF, CFP, PIP, TMP, FOS, E, TE, N

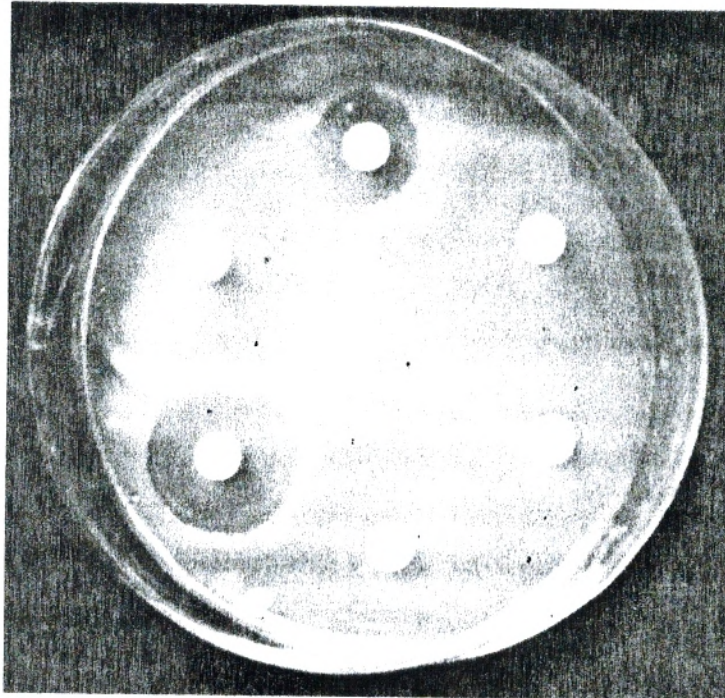


Figure 22 : Illustration d'une image de synergie entre une bêta lactamine (Carbenicilline) et un aminoside (Sisomicine)

Il faut attirer l'attention sur le rôle possible de l'environnement hospitalier dans l'entretien de l'infection, ceci est étayé par le niveau de résistance similaire retrouvé chez les souches humaines et l'environnement, dans notre étude ainsi que dans certains travaux (Panzig et al., 1999).

Outre le caractère sensible ou résistant des souches, l'antibiogramme a révélé chez 11% des souches une activité synergique due à l'interaction entre les molécules d'antibiotiques (Figure 22) :

- Bêta-lactamines (imipénème et pipéracilline, céf sulodine et ticarcilline, céf sulodine et pipéracilline, céfopérazone et imipénème).
- Aminoglycosides (amikacine et gentamycine)
- Une bêta-lactamine et un aminoglycoside (imipénème et nétilmicine, ticarcilline et tobramycine, imipénème et amikacine).

L'association de l'imipénème et la nétilmicine a été la plus active et pourrait être une alternative thérapeutique.

Panzig et al (1999) ont constaté que l'association amikacine et céfepime possédait une importante activité contre des souches de *P.aeruginosa* caractérisées par une multirésistance.

Watine et al (1995) ont signalé que les cinétiques de bactéricidie montrent que l'association fosfomycine/amikacine a été active sur 86% de leurs isolats (sérotypage O 12). Cette association pourrait être préférée à l'association céftazidime/amikacine pour le traitement probabiliste d'une infection due au sérotypage O 12.

V- PHENOTYPES DE RESISTANCE

Le comportement de *Pseudomonas aeruginosa* vis à vis de quatre β -lactamines ,Ticarcline, Céfotaxime, Céftazidime, et Imipénème, nous a permis de classer selon Vedel (1995) (Tableau 13) les souches selon leur phénotype de résistance.

Tableau 13 : Phénotypes de résistance

<u>Phénotype</u>	TIC	CTX	CAZ	IPM	Pourcentage (%)
Sauvage	S	I	S	S	9
Pénicillinase bas niveau (oxa-1/ oxa-4 etc. ; TEM)	I/R	I	S	S	10
Pénicillinase haut niveau (OXA ₂)	R	I	I/R	S	6
Pénicillinase haut niveau (PSE / CARB)	R	I	S	S	6
β -lactamase à spectre étendu (BSE)	R	R	R	S	9
Céphalosporinase hyperproduite dérépression partielle	I/R	R	I/R	S	16
Céphalosporinase hyperproduite dérépression totale	R	R	R	S	8
Imperméabilité large	I/R	I/R	I/R	S	17
Imperméabilité spécifique à l'imipénème	S	I	S	R	1

Les phénotypes mis en évidence (Tableau 13) sont les suivants :

✓ Le phénotype "imperméabilité large" prédomine par rapport à l'ensemble des autres phénotypes avec un taux de 17% ; ce phénotype se caractérise par une activité variable des β - lactamines antipycyaniques.

La variabilité de l'activité des β -lactamines est fonction de l'intensité du passage des antibiotiques à travers la membrane externe, les souches peuvent donc présenter des niveaux de résistance plus ou moins élevés, la céphalosporinase est produite (comme chez la souche sauvage) sur le mode inductible et la céftazidime reste plus active que l'aztréonam.

✓ Le deuxième phénotype prédominant est celui de la "céphalosporinase hyperproduite, dérépression partielle" avec un pourcentage de 16 %. Ce phénotype se différencie des phénotypes dus à la production d'une pénicillinase, par une perte d'activité de céfotaxime. A l'exception de l'imipénème, toutes les β - lactamines sont inactivées (à des niveaux différents) par ce mécanisme de résistance. En particulier, la céftazidime est plus hydrolysée que l'aztréonam par la céphalosporinase hyperproduite.

✓ Le phénotype "pénicillinase bas-niveau" caractérise 10 % des souches, il est déterminé par la production d'enzymes de type OXA (OXA-1, OXA-4,...) ou de type TEM. Il se caractérise principalement par une réduction ou une perte d'activité des pénicillines et en particulier de la ticarcilline. La céf sulodine est en partie hydrolysée par ces pénicillinases. La céftazidime et l'imipénème sont stables vis à vis de ces enzymes. Le céfotaxime est également stable mais peu actif en raison de l'imperméabilité naturelle de *Pseudomonas aeruginosa*.

✓ Le phénotype " β -lactamase à spectre étendu" est représenté par 9 % des souches, il est dû à la production de bêta-lactamases à spectre élargi (OXA-11, PER-1). Ces enzymes hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines, y compris celles de 3^{ème} génération (CTX – CAZ), et les monobactames (AZT). Par contre, l'imipénème est stable. Certaines de ces BSE sont peu sensibles à l'effet des inhibiteurs de β -lactamases

✓ Le phénotype "céphalosporinase hyperproduite, dérépression totale" caractérise 8 % des souches, ces mutants hyperproducteurs de céphalosporinase présentent une résistance à haut niveau aux β -lactamines antipyocyaniques, seul l'imipénème reste actif.

✓ Le phénotype sauvage concerne 9% des souches, l'ensemble des β -lactamines antipyocyaniques (TIC- CAZ – IPM) sont totalement actives. Une activité diminuée du céfotaxime est observée, à cause de sa pénétration insuffisante dans la cellule bactérienne.

✓ Le phénotype "pénicillinase haut niveau" PSE(CARB) a été trouvé chez 6 % des souches, il est dû à la production de pénicillinase dénommée PSE ou CARB (PSE-1/CARB-2, PSE-4/CARB-1). Il se différencie du phénotype Pénicillinase bas niveau par une hydrolyse plus importante de la ticarcilline et surtout de la céf sulodine. Par contre, la céftazidime, l'imipénème et même le céfotaxime ne sont pas inactivés par ces enzymes.

✓ Le phénotype "pénicillinase haut niveau OXA-2" qui est présent chez 6 % des souches semblerait se différencier du précédent par une réduction ou une perte d'activité de la céftazidime. Par ailleurs, les inhibiteurs possèdent une activité médiocre sur OXA-2.

✓ Le phénotype "impermeabilité spécifique à l'imipénème" a été observé chez une seule souche sur laquelle toutes les β -lactamines antipyocyaniques sont actives, à l'exception de l'imipénème.

Certaines souches (18%) présentent des phénotypes difficiles à identifier. En fait, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le mécanisme d'efflux agirait en synergie avec la faible perméabilité de la membrane externe pour donner des souches plus résistantes.

Les valeurs des CMI pour une même molécule varient considérablement entre les souches. Par exemple, pour la pipéracilline, la concentration s'étale de 2 à 256 µg/ml. Cet intervalle est encore plus important que celui détecté en Allemagne par Khurana et al (1994) se situant entre < 4 et > 128 µg/ml

Ainsi certaines souches présentent un haut niveau de résistance. Cette propriété pourrait avoir une corrélation directe avec l'échec thérapeutique (Cailleaux et al., 1997).

Une grande différence des CMI d'un antibiotique chez les souches laisse supposer l'existence de différents mécanismes de résistance. Le mécanisme de résistance aux antibiotiques hydrophiles peut être dû à une faible perméabilité de la membrane externe des *Pseudomonas* (Yoshimura et Nikaido, 1982). Tandis qu'une haute résistance est généralement déterminée par des gènes, codant pour les enzymes modifiant ou dégradant des antibiotiques, situés sur des transposons portés souvent par des plasmides ; vu leur mobilité, ces transposons peuvent se trouver aussi sur le chromosome et éventuellement sur les phages (Levy, 1982).

Quelques unes de nos souches présentent une résistance à de hautes concentrations de plusieurs antibiotiques à la fois. Ainsi, les souches O₃₈ et O₆₂ arrivent à résister à la majorité des antibiotiques ; même l'imipénème n'est pas épargné.

L'imipénème est la molécule la plus active sur les souches testées. A l'exception des souches multirésistantes (O₃₈, O₆₂, A₁), les CMI sont situées entre 1 et 4 µg/ml. Ces résultats concordent avec les concentrations décrites dans la littérature. Philippon (1998) a rapporté un intervalle CMI pour l'imipénème de 0,06 à 16 µg/ml. Il faut signaler que le caractère d'inducteur fort des bêta-lactamases de l'imipénème le défavorise dans l'usage courant au profit de la pipéracilline

En raison de l'importance de l'association Ampicilline-Gentamicine dans la pratique courante à l'hôpital de Tlemcen, nous nous sommes attelés à la détermination de sa CMI sur les *Pseudomonas*. Le constat est qu'elle a été très efficace contre les souches multirésistantes.

La multirésistance bactérienne, notamment du *Pseudomonas aeruginosa* vis à vis des bêta-lactamines, pose un réel problème thérapeutique. Certaines études ont montré que l'association entre l'amikacine et la céftazidime est très active vis à vis de ce germe. Panzig et al., (1999) et Watine et al., (1995) pensent que l'association fosfomycine et amikacine pourrait être une alternative thérapeutique pour le traitement probabiliste d'une infection causée par le sérotype O₁₂ caractérisé par sa multirésistance.

VII. CORRELATION ENTRE LES SEROTYPES ET L'ANTIBIORESISTANCE

A l'exception du sérotype O11 qui se distingue par sa présence à un taux de 14%, Il est difficile d'établir une corrélation entre la multirésistance et les autres sérotypes, en raison de leur faible fréquence.

Les résultats du tableau n°15 montrent une possible corrélation entre le sérotype O11 et le profil de résistance aux β-lactamines. Prises individuellement, on remarque que les molécules d'ampicilline (AM), d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), d'oxacilline (OX), de céfalotine (CF), de céfazoline (CZ), de céfoxitine (FOX) sont généralement inactives sur ce sérotype ; par contre, le céfotaxime (CTX), la ticarcilline (TIC), la piperacilline (PIP), la céftazidime (CAZ) la céfopérazone (CFP) et la césulodine(CFS) sont modérément actives, et enfin, avec un taux de 79 % d'efficacité, l'imipénème reste la molécule de choix.

Sur le plan de la multirésistance, les souches du sérotype O :11 présente des profils de résistance aux bêta-lactamines comprenant 7, 8, 9, 10, 12 et 13 antibiotiques (Tableau 12°). Cette diversité dans les antibiogrammes montre que les infections à sérotype ne sont pas à caractère épidémique.

La relation sérotype-résistance aux bêta-lactamines a été largement rapportée dans la littérature, particulièrement pour les sérotypes O :4, O :11 et O :12 (Vanhoof et al., 1993 ; Watine et al., 1995 ; Panayotis et al; 1997 ; Cailleaux et al., 1997 ; Hsueh et al., 1998) ; les caractères endémiques et épidémiques en milieu hospitalier de ces sérotypes ont été signalés par ces mêmes auteurs.

Les connaissances cumulées sur le comportement vis-à-vis des antibiotiques des sérotypes majeurs impliqués en pathologie infectieuse sont d'un grand apport dans l'antibiothérapie prédictive.

Tableau 15 : Pourcentage de résistance aux β - lactamines des souches du sérotype O₁₁.

Antibiotique	Pourcentage de résistance du sérotype O ₁₁ (%)
AM	100
AMC	100
TIC	78
PIP	28
OX	92
CF	100
CZ	93
FOX	92
CTX	71
CFP	50
CFS	50
CAZ	57
IPM	21

VIII. DETECTION DES β -LACTAMASES

Les résultats de la mise en évidence de la production de β -lactamase montrent qu'un taux de 24 % de souches élaborent ces enzymes.

Bien que les tests utilisés soient qualitatifs, nous avons observé que certaines souches possèdent une importante production de bêta-lactamase, se traduisant soit par un virage rapide dans les tests acidimétriques et PADAC, soit par une décoloration envahissante dans le test iodométrique ; ce qui a permis de les classer en catégories selon leur niveau de production (Tableau 16)

Nous remarquons que globalement, les souches multirésistantes possèdent souvent une importante capacité de produire des β -lactamases. En effet, les niveaux de production de bêta-lactamases sont relativement en corrélation avec les profils d'antibiogramme. Ainsi les souches fortement productrices de bêta-lactamases correspondent aux souches multirésistantes. Cette synthèse accrue de bêta-lactamases peut être due à plusieurs mécanismes :

- Dérépression du gène de la céphalosporinase ampC inductible.
- Hyperproduction d'une bêta-lactamase à spectre étendu.
- La synthèse conjointe de deux ou plusieurs bêta-lactamases par l'acquisition d'un support génétique supplémentaire.

Tableau 16 : Catégories de souches productrices de bêta-lactamases

Catégorie	Souches
1	2w ₁₁ - 15* -1SB - 2'S ₃ - PO ₂ - O ₆₅
2	O56- R ₁ - P ₄ - P _B - 4SB - 9070 - PO ₅ - 2'S ₁
3	O38- S ₁₉ - O ₁ * - P ₃₈ - V ₅ - PO ₁ - MA ₃ - 3SB - F ₅ - O ₉ * - F ₆

1 : souches faiblement productrices de bêta-lactamases

2 : souches moyennement productrices de β -lactamases.

3 : souches fortement productrices de β -lactamases.

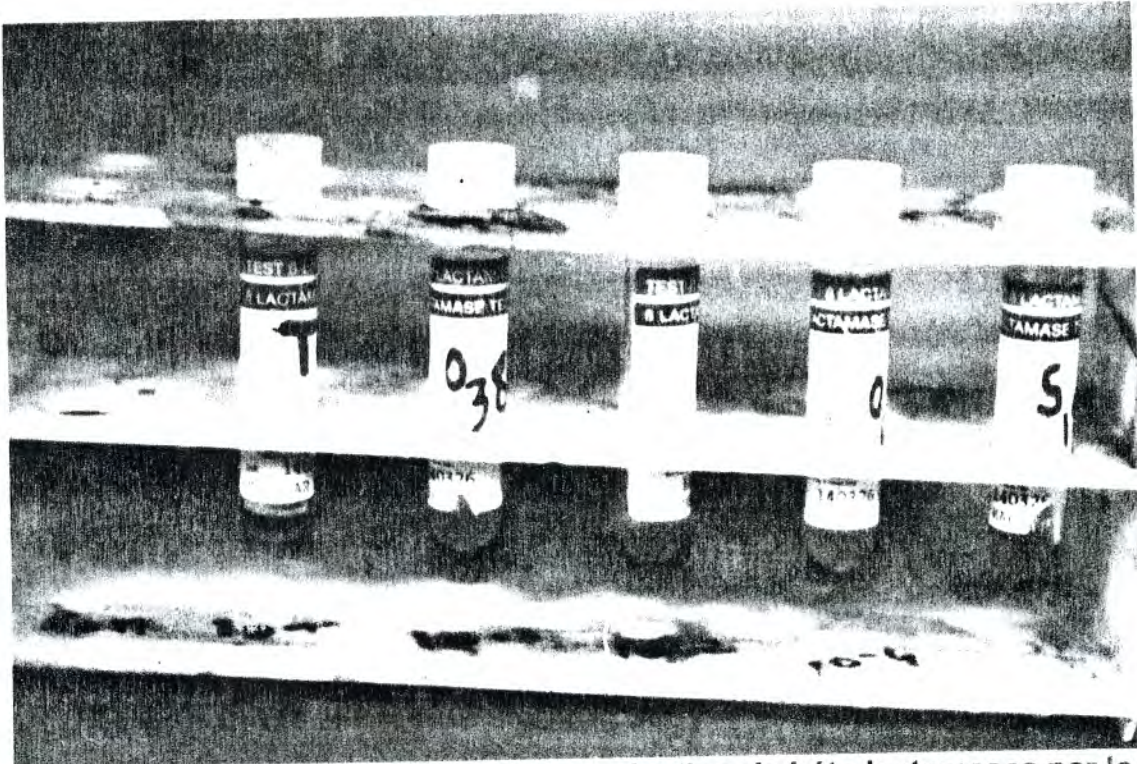


Figure 23 : Mise en évidence de la production de bêta-lactamases par le test PADAC

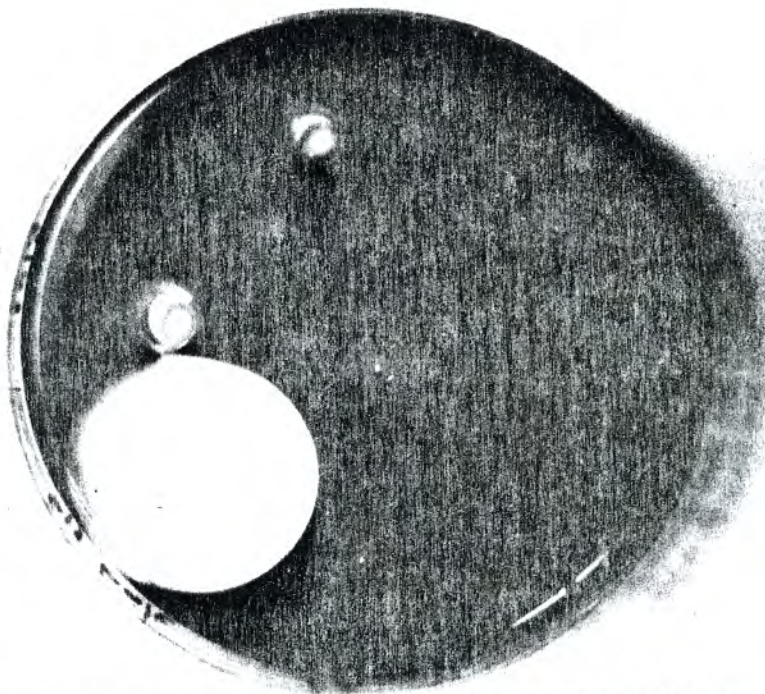


Figure 24 : Mise en évidence de la production de bêta-lactamases par le test iodométrique

Les souches productrices de bêta-lactamases appartiendraient aux phénotypes de Vedel (1995) suivants :

- Phénotype complexe. (06 souches) pouvant résulter d'une synergie entre une résistance enzymatique et non enzymatique.
- Phénotype bêta-lactamase à spectre étendu (04 souches)
- Phénotype céphalosporinase dérégulation totale (03 souches)
- Phénotype pénicillinase haut niveau (02 souches).
- Phénotype pénicillinase bas niveau (01 souches).
- Phénotype imperméabilité large (04 souches).
- Phénotype imperméabilité spécifique à l'imipénème (01 souches).

Il faut noter le faible nombre de souches productrices de bêta-lactamases par rapport à ce qui est attendu, au vue des résistances retrouvées chez l'ensemble des souches qui laissent suggérer une implication importante des mécanismes enzymatiques. Ceci est dû au fluctuation que l'on a observée chez nos souches concernant la synthèse de bêta-lactamases, ce qui nous a amené à restreindre le nombre de souches productrices à celles chez qui on a observé une parfaite reproductibilité.

IX. RECHERCHE DES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI PAR LE TEST DE SYNERGIE

Les résultats montrent que seulement 5 souches (S19, V5, 9070, R8, R3) produisent une bêta-lactamase à spectre élargi. Cette production se traduit par une image de synergie entre l'association amoxicilline-acide clavulanique et une céphalosporine de 3^{ème} génération. (Figure 25)

Le nombre réduit de souches à bêta-lactamases à spectre élargi détectées par le test de synergie par rapport aux 9 souches appartenant à ce phénotype déduites des résultats de l'antibiogramme est souvent en rapport avec la difficulté de mise en évidence chez *P.aeruginosa* des bêta-lactamases à spectre élargi par le test de synergie. En effet, certaines des bêta-lactamases à spectre élargi sont peu sensibles à l'effet des inhibiteurs des bêta-lactamases. De plus, ce test est plus performant avec certains antibiotiques tel que la ticarcilline+acide clavulanique et une céphalosporine de 3^{ème} génération ou une monolactame (aztréonam) (Vedel 1995).

La corrélation entre le caractère bêta lactamase à spectre élargi de ces souches et un profil de résistance étendu est établie ; en effet, celles-ci résistent aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

Ces bêta-lactamases à spectre élargi seraient de type OXA (OXA-11) et PER (PER-1).

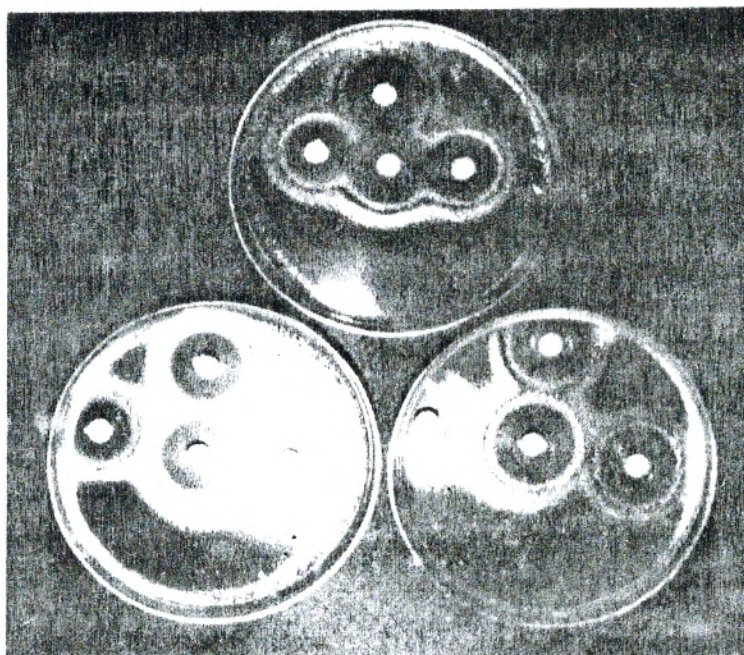


Figure 23 : Illustration du test de synergie

X. RECHERCHE DU CARACTERE INDUCTIBLE DES BETA-LACTAMASES

Le caractère inductible de la production d'une bêta-lactamase se traduit sur l'antibiogramme par une diminution de la zone d'inhibition autour d'un disque de bêta-lactamine «indicateur» disposé en face d'un disque d'une autre bêta-lactamine «inducteur», donnant l'image classique d'un antagonisme. Dans notre cas, nous avons utilisé l'imipénème comme inducteur et la pipéracilline comme indicateur.

L'inductibilité de l'expression de bêta-lactamases a été observée chez 13 de nos souches (V₂, F₈, M₃₇, F₉, D7-4, E*, A₁₃, F₇, P₄₅, A₁₅, 2W₁₁, S₁₀, 2S₃); celles-ci produiraient donc des bêta-lactamases de type céphalosporinases inductibles. En majorité, ces souches font partie du phénotype sauvage, tandis que certaines peuvent être assimilées au phénotype pénicillinase bas niveau.

XI. TRANSFERT GENETIQUE PAR CONJUGAISON

Quatre souches sur les cinq soumises à un test de conjugaison ont transféré une partie de leurs caractères de résistance à la souche réceptrice *E.coli* k12. Les transferts ont concerné une molécule extrêmement importante qui est l'imipénème, ainsi que la céfoxitine, la pipéracilline, l'amoxicilline- acide clavulanique, les sulfamides et l'acide pipémidique.

Il faut signaler comme le montre le tableau 17, le transfert en bloc de ces caractères. Cette expérience laisse supposer la nature plasmidique de certains phénotypes de résistance et leur codage par la même structure génétique.

On note l'absence de transfert de la résistance à la céftazidime, la céfsulodine et la ticarcilline. Ce résultat peut être dû à leur présence sur un ou des plasmides non transférables ou à l'incompatibilité du réplicon qui les porte avec l'environnement physiologique propre à *E.coli*, ou bien encore carrément à leur support chromosomique. Dans ce dernier cas, ces phénotypes de résistance seraient le fait de céphalosporinases.

Il faut remarquer le caractère transférable très important de la résistance à l'imipénème, notamment de *Pseudomonas* vers *E.coli*, ce qui laisse supposer sa localisation sur un plasmide ubiquitaire, avec tout ce que cela signifie comme risque potentiel de dissémination de cette résistance.

Dans le même sens, Watanabe et al (1991) ont rapporté chez *P.aeruginosa* la nature transférable d'une imipénémase à large spectre vis-à-vis des bêta-lactamines, cependant le plasmide codant pouvait être transféré vers une souche de *P.aeruginosa* mais pas vers une *E.coli*.

D'autres travaux ont montré la possibilité de transfert par mobilisation de la résistance à l'imipénème de *P.aeruginosa* vers *Proteus mirabilis* (Krcméry et al., 1991), ainsi que le transfert direct de cette résistance de *P. aeruginosa* à *P.aeruginosa* (Hopkova et al., 1993.)

Tableau 17 : Résultats des transferts génétiques par conjugaison

Code	Profil de résistance	Déterminant transférés
P ₁	IPM - TIC - FOX - AMC - CAZ - CFS - PIP - E - PI - S	IPM - FOX - PIP - AMC - S
P ₂	IPM - TIC - FOX - AMC - CAZ - CFS - E - S	
P ₃	IPM - TIC - FOX - AMC - CAZ - PIP - E - PI	IPM - AMC - PI
P ₄	IPM - TIC - FOX - AMC - CFS - E - S	IMP - FOX - AMC - S
P ₅	IPM - TIC - FOX - AMC - CAZ - PIP - E - S	IPM - FOX - AMC - PIP

XII. CURAGE PLASMIDIQUE

Les essais de curage plasmidique sur des souches de *Pseudomonas* n'ont pas été concluants. Par contre, des curages ont été obtenus sur 3 souches d'*E.coli* transconjugants à l'aide du bromure d'éthidium à la concentration de 1024 µg/ml.(Tableau 18).

Le résultat négatif du curage des *Pseudomonas* est probablement dû à la difficulté de pénétration des agents curants dans la cellule.

Les pertes de phénotypes de résistance chez les transconjugants sous l'action de substances curantes confirment le caractère plasmidique, donc acquis, des phénotypes de résistance et la liaison génétique entre certains d'entre eux. Ainsi, la comparaison des profils de résistance des transconjugants avec ceux des souches curées conforte la nature extrachromosomique et transférable de la résistance à l'imipénème et suggère une liaison entre ce dernier phénotype et la résistance aux sulfamides.

Tableau 18 : Résultats des essais de curage plasmidique par le Bromure d'Ethidium

Code	Antibiotype des transconjugants	Antibiotype après curage
TP ₁	IPM – FOX – PIP – AMC – S	FOX – PIP – AMC
TP ₂	IPM – AMC – PI	AMC
TP ₄	IPM – FOX – AMC – S	FOX – IPM
TP ₅	IPM – FOX – AMC – PIP	FOX – AMC - PIP

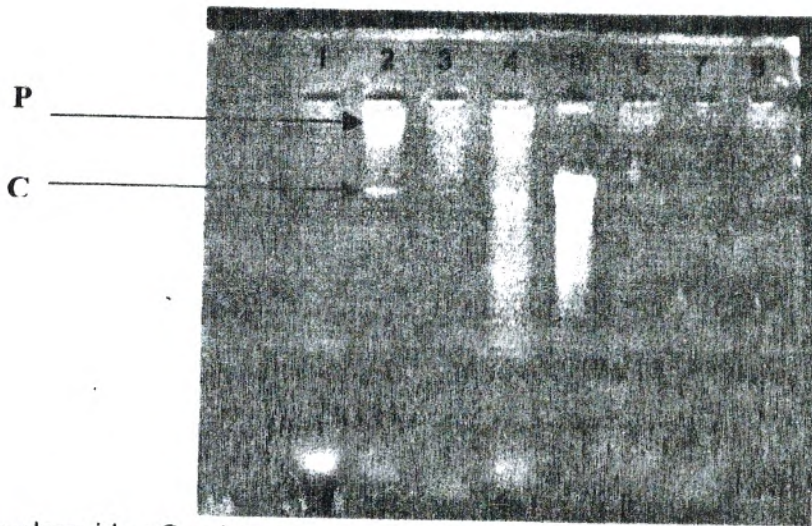
XIII. ANALYSE PLASMIDIQUE DES SOUCHES

L'analyse du culot plasmidique des souches a révélé la présence d'un plasmide au moins de grande taille chez 5 souches : PS6S3 , S11P43 , P4 , O65, A1. Un petit plasmide a été détecté chez la souche K13S3. (Figure 26 et 27)

Bien que la conjugaison et le curage aient confirmé le caractère transférable d'au moins d'une partie des marqueurs de résistance aux bêta-lactamines, ainsi qu'à d'autres antibiotiques ; il nous est difficile de corréler de façon précise la résistance avec les profils plasmidiques.

Ce qu'on peut déduire de cette expérience, c'est que les souches sont pauvres en plasmides, du moins sur le plan quantitatif, ceux retrouvés sont de haut poids moléculaire et il n'y a pas forcément une relation entre le phénotype de résistance selon Vedel (1995) et le profil plasmidique.

Cependant, il y a lieu de signaler le rapport entre la résistance aux bêta-lactamines associée avec celle à d'autres antibiotiques, notamment les aminosides et la présence de plasmides de haut poids moléculaire (Petit et al., 1990 ; Jacoby et Sutton, 1991 ; Hall et al., 1993 ; Philippon, 1998).



P : plasmide ; C : chromosome

Figure 26 : Profil plasmidique des souches isolées sur gel d'agarose : 1(K₁₃S₃), 2(A1), 3 (S₈), 4(O65), 6(P₄), 7(S₁₉), 8(O38).

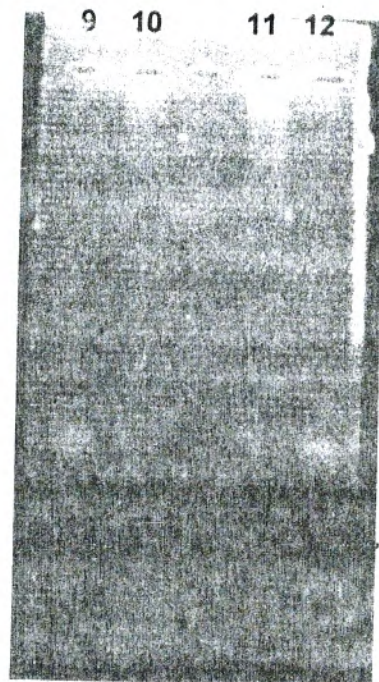


Figure 27 : Profil plasmidique de quelques souches de *Pseudomonas* sur gel d'agarose : 9(O₁*), 10(S₁₁P₄₃), 11(PS₈S₃), 12(F₈).

CONCLUSION



CONCLUSION

L'évaluation de l'état de la résistance aux bêta-lactamines de 100 souches de *Pseudomonas aeruginosa* a mis en évidence une multirésistance vis à vis des antibiotiques antipyocyaniques couvrant la pipéracilline, la ticarcilline, la céftazidime et la céfsulodine, ainsi que d'autres antibiotiques, hors bêta-lactamines, tels que la péfloxacin, l'amikacine, la tobramycine, la fosfomycine... Cette résistance semble être de haut niveau, au vue des CMI retrouvées pour certaines molécules. Il faut signaler l'activité satisfaisante de l'imipénème, bien qu'il faille être attentif au risque de diffusion des résistances observées sur certaines souches.

Le sérotypage a montré une diversité dans les sérotypes des souches avec cependant une singularisation du sérotype O 11 qui atteint 14% des souches. Ce sérotype a été trouvé multirésistant avec une grande diversité dans les biotypes. Cette diversité augure du caractère non épidémique de ces souches donc des infections.

La production de bêta-lactamases a été mise en évidence chez 24% des souches et elle a été corrélée à la résistance. La propriété inductible des bêta-lactamases, donc des céphalosporinases, a été retrouvée chez 13% des souches, ces dernières appartiendraient globalement aux phénotypes sauvages. Le test de synergie a permis de détecter les bêta-lactamases à spectre élargi chez 5% des souches qui résistent aux céphalosporines de 3^{ème} génération et pour certaines à l'imipénème.

Les essais de transfert génétique par conjugaison et de curage ont permis de montrer le caractère plasmidique, donc acquis, et transférable des phénotypes de résistance, en particulier à l'imipénème, ainsi qu'une possible liaison génétique entre eux.

L'analyse du culot plasmidique révèle la présence d'au moins un plasmide de haut poids moléculaire chez certaines souches, qui pourrait être le support génétique de bêta-lactamases transférables notamment à spectre élargi, et même d'autres marqueurs de résistance aux antibiotiques, comme les aminosides.

Le niveau et la nature extrachromosomique de la résistance observés chez *Pseudomonas aeruginosa*, avec tout cela qu'implique comme risque de diffusion de cette résistance vers des souches de la même ou d'autres espèces, peuvent constituer un véritable obstacle thérapeutique.

Dans ce cadre, la lutte contre ce fléau doit porter aussi bien sur la prévention que sur une antibiothérapie maîtrisée.

En dehors des situations imposant un traitement d'urgence empirique qui doit être basé sur des données épidémiologiques (surveillance de l'acquisition et de la diffusion des résistances), l'antibiothérapie est fondée, au-delà des signes cliniques et de la localisation du site d'infection, sur l'isolement et l'identification du germe, sa sensibilité aux antibactériens disponibles (antibiogramme et CMI ou CMB), sa fréquence de mutation vers la résistance, la taille de la population bactérienne, la pharmacocinétique et les risques toxiques. Ce sont ces données qui conditionneront le choix de la molécule, la monothérapie ou l'association, la posologie, la durée, la voie d'administration...

En complément à l'utilisation rationnelle des antibiotiques, l'optimisation du contrôle de l'évolution de la résistance passe par les mesures d'hygiène hospitalière.

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'identifier les bêta-lactamases impliquées dans les résistances observées, les structures génétiques qui les portent et les réarrangements génétiques à l'origine de l'extension de leur spectre de résistance. Sur un autre plan, à des fins épidémiologiques, il est nécessaire de typer génétiquement (ribotypage ou polymorphisme chromosomique) les souches.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - ADAM Y. et al. (1992) – Médicaments antibiotiques : traité de chimie thérapeutique – Volume 2. éditions médicales internationales Lavoisier.
- 2- Antibiogramme Pasteur (1989). Détermination de la sensibilité aux agents antibactériens. Diagnostic Pasteur.
- 3- ARLET G. PHILIPPON A. (1997) les bêta-lactamases : une évolution sous la contrainte in : antibiotique. Ed. John Libbey. Eurotext. P.66-76.
- 4- ARLET et LAMBERT (1999) in BRISKIER A. (1999), Antibiotiques agents antifongiques, Ed. ellipses.
- 5 - ASTRUC J. (1997). Infection à *Pseudomonas aeruginosa* maladies infectieuses – guide du traitement le popi. p. 111-114.
- 6- AUBERT G., PEYLE N., DUMONT N., EL FASSI M., DORCHE G., (1990). Emergence d'une souche d' *Escherichia coli* hyperproductrice de cephalosporinase au cours d'un traitement par l'association amoxicilline plus acide clavulanique. Ann. Biol.Clin. 48 :449 - 454.
- 7 - AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. et MONTEIL H. (1992). Bactériologie clinique. Edition emarketing France.
- 8 - AVRIL JL ,DABERNAT H ,DENIS F ,MONTEIL H (2000).Bactériologie clinique. 3^{ème} édition ; p 294-31
- 9 - BERCHE P., GAILLAR J.L. et SIMONET M. (1988). Les bactéries des infections humaines. Bactériologie. Edition Flammarion. p 230-238.
- 10- BERGEY'S MANUAL of systematic bacteriology. 1986. 9^{ème} ed. Williams and Wilkins. Co. Baltimore.
- 11- BERGOGNE – BEREZIN E., DELLAMONICA P. (1995) Anthiobiothérapie en pratique clinique. ed Masson.
- 12- BERGOGNE – BEREZIN E., DELLAMONICA P. (1998) Anthiobiothérapie en pratique clinique. ed Masson.
- 13- BERNARD H., TANCREDE C., LIVRELLI V., MORAND A., BARTHELEMY N., (1992). Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated tap water in a neurosurgery intensive care unit. Journal of hospital infection. 39 : 53 – 6
- 14- BERT F., LAMBERT – ZECHEVSKY N.(1997). Antibiotic resistant patients in *Pseudomonas aeruginosa* : in 8 year surveillance studie in french hospital, Int. J. Antimicrob Agents ; Vol 9, p : 107- 12
- 15- BERT F., MAUREC E., BERRY P. et LAMBERT – ZECHEVSKY N., (1998). Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap- water in a neeurosurgery intensive care unit. Journal of hospital infection. 39 : 53- 52

- 16- BERT F., LAMBERT – ZECHEVSKY N. (1999). Résistance aux antibiotiques et problèmes thérapeutiques posés par *Pseudomonas aeruginosa*. Presse MED :28 :451-8.
- 17- BINGEN E., BENACORCI S., ROHRLICH P., DUVAL M., LHOPITAL S., BRAHIMI N., VILMER E., GOERING R.V. (1996). Molecular epidemiology provides evidence of genotypic heterogeneity of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* serotype O:12 outbreak isolates from a pediatric hospital. Journal of clinical Microbiology. Vol 34. n 12 p 3226 - 3229.
- 18- BLANC D S PETIGNAT C JANIN B BILLE J FRANCIOLI P (1997) Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization : a prospective epidemiologic study
- 19- BOUANCHAUD D.H.et CHABBERT Y.A. (1971). Practical effectiveness of agents curing R factor and plasmids. Ann.N.Y. Acad.Sci. 182 : 305 – 311.
- 20- BOUSQUET J.C. et JACOBS (1982). Notion d'antibiotique en pratique . ed. Bristol.
- 21- BRADLEEY D.E. (1981). Conjugation plasmid of *Escherichia coli* K₁₂ and *Pseudomonas* species in : Molecular Biology pathogenicity and ecology of bacterial plasmids (Levy S.B., Clowes R.C. and Koeing E.L. eds) p 217- 226 plenum New York.
- 22- BRISKIER A.,(1999), Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques, ed. ellipses.
- 23- BUTTERY J., FRACP P., SAMANTHA J., ALBASTER BSC., RALF G., HEINE M.D., FRACP S.M., SCOTT R.N., RAYLEE A., CRUTCUFIELD R.N. and GARLAND F., (1998). Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology ward related to bath toys pediatric infection disease J. Vol17 n°6 : 509 – 13.
- 24- CAILLEAUX V ; MULIN B CALLIPIERT G JULLIOT M C THOUVEREZ M TALON D (1997) Epidemiological study of variations in β -lactam antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in two intensive care units. Journal of Hospital Infection ;37,217-224.
- 25- CAMBAU E.(1996) Antibiotiques , Maladies infectieuses , La revue du praticien. Paris
- 26- CARBON C., RECNIER B., SALMOT G., VILDE J.L., YENI P., (1995). Médicaments antiinfectieux. Ed. Flammarion Médecine Sciences.
- 27- CAVALLO J.D., GEROME P., et FABRE R., (1997). *Pseudomonas aeruginosa* en 1997 Feuille de biologie. Vol XXXVIII-N°214, 11 – 22
- 28- CHABBERT Y.A., (1984). Sensibilité bactérienne aux antibiotiques ,in Bactériologie Médicale. 1^{er} ed. Flammarion. p 204 – 212.
- 29- CHENG K , SMYTH R, GOVAN J R W ; DOHERTY C; WINSTANLEY C, DENNING N, HEAF D P , SÆNE H V , HART A C (1995) . Spread of β -

- lactam -resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. THE LANCET 348;p 639-642
- 30- CHEN H.Y., YUAN M., LIVERMORE D.M. (1995). Mechanisms of resistance to β - lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. J.Med.Microbial., 43 : 300 – 9.
 - 31- CHETOUL H., MELIN P., STRULENS M.J., DELHALL E., MUTRO NIGO M., DERYCK R., et DEMOL P., (1997). Comparaison of boityping, ribotyping and pulsed – field- del Electrophoresis for investigation of a common source outbreak of *Burkholderia pickehii* bacteremia, Journal of Clinical Microbiology. Vol 35 N° 6, p 1398 – 1403.
 - 32- COLLE S.T. et NICOLAS M.H., (1986). β - lactam resistance mecanismes in Gram negative bacteria. Microbial 3 N°11 p 334 – 339.
 - 33- Communiqué 2000 – 2001, comité de l'antibiogramme Société Française de Microbiologie.
 - 34- CORNELIS P., HOHNADEL D., et METER J.M., (1989). Evidence oh different pyoverdine – mediated iron éptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strain infection.Immunite 57 : 3491-3497.
 - 35- COURVALIN P., GOLDSTEIN J., PHILIPPON A., SIROT J. (1985). Antibiogramme. MPC ed. p 225-235.
 - 36- COUTURE B., (1990). Bactériologie médicale : étude et méthodes des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical, ed DECARIE – VIGOT.
 - 37- CURCIANI M., MALENA N., AMALFITAN G., MONTI P., and BONOMI L., (1998). Molecular epidemiology in a cluster of case of post operative *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis. Clinical Infections Diseases : 26 : 330-3
 - 38- DAVIS J. (1994). Inactivation of antibiotics and the disseminatio of resistance genes. Science ; 264 : 375 – 82.
 - 39- DELSAL G., MANFIOLETTI G., and SCHNEIDERT C., (1988). One tube plasmid DNA mini preparation suitable for sequencing. Nucl.acids RES. 16 : 9878.
 - 40- DIB C., TRIAS J., JARLIER V., (1992). Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux β - lactamines par imperméabilité. R.P. 25.
 - 41- DOUDOROFF M., et PALLERONI N.J.(1974). Bergey's manual of systematic Bacteriology. 8^{ème} ed., William and Wilkins co. Baltimore.
 - 42- DUVAL J. (1989). Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens, in Bactériologie Médicale. 2^{ème} ed. p 273- 291.
 - 43- DUVAL J. et SOUSSY C. J. (1990) . antibiothérapie, bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques. 4^{ème} édition Masson.

- 44- EMORI T G et GAYNES R P, (1993) An overview of nosocomial infections including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev, Vol 6, p:428-42
- 45- FERRONI A., NGUEN L., PRON, B., QUESNE G., BRUSSET M.C., BERCHE P., (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric surgical unit associated with tap- water contamination.
- 46- FINEGOLDE S., MARTIN W.J., (1982). Diagnostic Microbiology. 6^{ème} edition THE C.V. Mosby compagny London.
- 47- FLOURNOY D.J., DELBRADIC K.A., KADRI S.M.S. (1986). Comparaison of the antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from two hospitals. Sci 79 : 906-908
- 48- FRENEY J. et al (1994). *Pseudomonas aeruginosa* Manuel de bactériologie clinique. Vol. 1.83.91 Vol3. 1141-1159
- 49- FRERE J.M., JORIS B., GRANIER B., MATGNE A., JACOB F., et BOURGUIGNON – BEELEROID (1991). Diversity of the mechanism of resistance to β - lactam antibiotics. Rev Microbiol 142 : p 705-710.
- 50- FRERE J.M., MATAGNE A., LAMOTTE-BRASSEUR J. (1998). Catalytic properties of class A β - lactamase efficiency and diversity. Biochem. J. 330, 581 - 598.
- 51- GERPB (1995). Groupe d'étude de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux β - lactamines. Surveillance de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en milieu hospitalier. Lettre de l'Infectiol ; X :660-1
- 52- GERPB (1998). Groupe d'étude de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux β -lactamines. Mécanisme de la résistance aux β -lactamines parmi les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées en France. Lettre Infectiol. ; XII, 106 – 7.
- 53- GERBAUD G., (1983). Perte plasmidique spontanée et provoquée. Microbiological reviews. Vol 47, p 41 – 48.
- 54- GHERINOT M.L., (1994). Microbial iron transport. Annu. Rev. Microbiol 148 : 743- 772.
- 55- GHUYSEN J.M., NGUEN – DISTECHE M., ROUSSET A., (1986). In the bacterial L- form Microbiology series Vol 17, ed MARCEL DEKKER.
- 56- GOTOH N, NUNOMURA K, NISHINO T. (1990) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Cefsulodin : modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 25, 513-523.
- 57- GRIFFITH SJ NATHAN C SELANDER R K et al (1989) The Epidemiology Of *Pseudomonas aeruginosa* in Oncology patients in a general hospital. J Infect Dis , 160:1030

- 58- Grossato A., Sartori R., Fontana R. (1991). Effect Of Non- β -Lactam Antibiotic Pn Penicillin -Binding Protein Synthesis Of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 27 : 263 – 271.
- 59- HALL L.M.C., LIVERMORE D.M., GUD D., AKOVA M., AKALIN H.E. (1993). OXA-11, an extended – spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chemotherapy* ; 5 N° 15, p14 – 16.
- 60- HELLALI A(1999). Bases de pharmacologie. 150 pages
- 61- HUPKOVA M; BABALOVA M ;SCHÄFER V ; BLAHOVA J ; KRCMERY V(1993). Transferable Resistance to Imipeneme in Hospital Isolate Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chemotherapy*, 5 N° 15 , p. 14-16.
- 62- HSUEH P., TENG L., YANG .P., CHEN Y., HO S., LUH K. (1998). Persistence of a multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J. of Clin. Microbiol.* ; vol 36, N° 5, p : 1347 – 1351.
- 63- JACOBY GA (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended –spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents and chemother* ; 35, 164-169.
- 64- JACOBY GA (1994) Extrachromosomal resistance in Gram -negative organism: the evolution of β lactamase . *Trends Microbiol* 2:357-60.
- 65- JARLIER V(1988) b . Phénotypes de résistance aux β -lactamines : Description et fréquences , place d'*Enterobacter cloacae* . *Med Mal Inf* ; Hors série ,38: 32 – 40.
- 66- JARLIER JL, BILHARI D J , SUTER PM, BRUINING H A, WHITE J, NICOLAS-CHANOIN MH , WOLFF M , SPENCER R C , HEMMER M(1995) . The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe . Results of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) study . EPIC International Advisory committee. *JAMA*. 274; 639 - 44.
- 67- JARLIER V., (1997). Mécanisme d'action des antibiotiques, in : *Antibiotique*. Ed John Libby p 37- 44.
- 68- JARLIER V., BERCHE P., GUTMANN L ;, LEVY Y. (1997). Mécanisme de résistance aux antibiotiques. 52- 53 in *Médecine thérapeutique*. Vol 3ed hors série , John Libbey
- 69- JOLY B; CLUZEL R; HENRI PH ; BARJOT J ;(1975) . *Ann . Microbiol (Inst Pasteur)* ;127B,57-68.
- 70- JUMAA P , CHATTOPADHY B.(1994). Outbreak of Gentamicin-Ciprofloxacin resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit , traced to contaminated quivers . *J Hosp Infect* ;28: 209-18

- 71- KADO C.L., et LIU S.T., (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145 : 1365-1337.
- 72- KAMOUN C. (1997) Méthodes et appareils biochimiques. 350 pages
- 73- KAPLAN – DELPECH J. C. (1998). Biologie moléculaire et médecine.
- 74- KARLOVSKY J.A., HOBAN D.J., ZELENISTSKY S.A., ZHANEL G.I.G. (1997). Altered DNA and ANR gene expression in aminoglycosid adaptative resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. antimicrobial. Chemother ; 39 : 1970 - 1972.
- 75- KERR J R ; MOORE J E, CURRAN M D , GRAHAM R , WEBB C H, LOWRY k G, MURPHY P G , WILSON T S , FERGUSON W P, (1995) . Investigation of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit by random amplification of polymorphic DNA assay. Journal of Hospital Infection ; 30 , p 125-131.
- 76- KIESER T.(1984). Factor affecting the isolation of DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* : plasmd 12 : 19 -- 36
- 77- KI- YOUNG , VERSTRACTE W. (1993). Significance ou siderophores in iron acquisition by living organisms, R D A. J. Agri. Sci : 35(2) : 291 – 304.
- 78- KHURANA C M , WOJACK R (1994) Prevalence of Ciprofloxacin Resistance in Multi resistant Gram -Negative Intensive Care Unit isolates. Infection 22 Suppl 2.
- 79- KREMERY V., LESICKA M., BMAHOVA J., SCHAFER V. (1991). Indirect transfert of resistance to imipenem in a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. chemother ; 3, 6 : 363 – 366.
- 80- LABIA R., (1999). Le peptidoglycane et le mode d'action des antibiotiques β - lactamines in Antibiotique agents antibactériens et antifongiques, ed Allipse, p : 429 – 434.L
- 81- LANKFORD C.E.(1973). Bacterial assimilation of iron. Crit. Rev. Microbial 2 : 273 – 331.
- 82- LARABI et al. (2001). Epidémiologie des infections urinaires dans la région de Menzl Bourguiba : à propos de 933 cas. La Tunisie Médicale. Vol 79 N° 14, p : 459 – 434.
- 83- LARPENT J.P., LARPENT – GOUGAUD M., (1985). Elements de microbiologie, ed Hermann p 177 – 183.
- 84- LEDUC M, KASRA R., VAN HEIJENOORT J. (1985). Correlation between degradation and ultrastructure of peptidoglycan during autolysis of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 152 : 26 – 34.
- 85- LEMINOR L., VERON M. (1989). Bactériologie médical, 2^{ème} edition Flammarion Medecine Science.
- 86- LENON E et DECICCO T(1991) Plasmid Of *Pseudomonas cepacia*

- strains of diverse origins. Applied And Environmental Microbiology ;57,N°8 p2345-2350.
- 87- LEVY S.B. (1982). Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. Lancet 10 : 83 – 88.
 - 88- LINDH E., DORNBUSH K., JALAKAS K., FORSGREN A.(1990). Antibiotic susceptibility and β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacter* sp.APMIS 98, p 462 – 470.
 - 89- MARCHAL B.J., BOUDON N.J. et RICHARD D.(1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin,p 486.
 - 90- MARTINEZ J.L., DELGADO – IRIBARE A ? and BAQUERO F., (1990). Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. FEMS Microbial Rev. 75 : 45- 56..
 - 91- MASECAR B.L., CELFSK R.A., ROBILLARD N.J.(1990). Analysis of acquired ciproflaxine resistance in a clinical of *Pseudomonas aeruginosa* agents and chemotherapy. Vol 34 n°4, p 281 – 286.
 - 92- MASUDA N ,OHYA S . .(1992) Cross resistance to meropenem, cephem and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* .Antimicrob Agents Chemother ;36,1847-51.
 - 93- MASUDA N, GOTOH N, OHYA S, NISHINO T.(1996) Quantitative correlation between susceptibility and Opr production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob Agents Chemother ;40,909-13.
 - 94- MAZARIOLL A., CORNAGLIA G., PICCOLI P., LAURETTI L., RICCIO M.L., ROSSOLINI G.M., FONTANA R. (1999). Carbapenem hydrolyzing metallo- beta- lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. CLIN. Microbial Infect. Dis Vol 18.
 - 95- MEIDEROS A. (1984) β lactamase. British Medical Bulletin 40 N°1p 18-27.
 - 96- MEIDEROS A A .(1997) Recent increase in resistance : mechanisms and organisms .Evolution and dissemination of β -lactam ases accelerated by generations of β -lactam antibiotics . Clinical Infectious Diseases. 24(1): 19-45.
 - 97- MEYER J., AZELVANDRE P., CLAUDE J. (1992). Iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* calicilic acid. A siderophor of *P. fluorescens* CHAO, Biofactor, 4 : 23 – 27.
 - 98- MICHEL – BRIAND Y.,(1993). Infection à bacille pyocyanique, ed Technique Encycl-med-chir- maladies infectieuses 14
 - 99- MILLER G.H.(1994). Resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas* trends in Microbiology, 2 ; 347 – 352.
 - 100- Ministère de la santé (2000). 2^{ème} rapport d'évaluation surveillance de la

- résistance aux antibiotiques. Projet de l'OMS. Edition et publication ANDS.
- 101- NAKAE T. (1991). The probleme in the outer membrane permeability and the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, The KITAZATO archives medecin ;vol 64 n° 2-3, 250 – 251.
 - 102- NEIDHART J.B.,(1998). L'adaptation génétique :le génome et sa plasticité physiologie de la cellule bactérienne une approche moléculaire. 250 - 251.
 - 103- NEILAND J.B. (1981) Microbial iron compounds. Ann. Rev. Biochem 50 : 715 – 731.
 - 104- NEU H.C. (1987). Biochemical basis of antimicrobial and bacterial resistance. Bull. NewYork Acad Med. 63 : 295 – 317 .
 - 105- NEU H. C. (1988). Définition et classification des β - lactamases Medecine et maladies infectieuses Hors séries p : 7- 10.
 - 106- NEU H.C. (1992). The crisis un antibiotic resistance. Scie,ce 257 p : 1064-1073.
 - 107- NEUMAN M. (1990). Vade – mecum es antibiotics et agents chiomiothérapeutique 5 ed Maloine
 - 108- NIKAIDO H (1992) Porins and specific channels of bacterial outer membranes . Molecular Microbiology . 6(4) : 435-442
 - 109- NIKAIDO H (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux . Science, 264, 382-388
 - 110- NOVICK R., (1981) Les plasmides pour la science 40 – 46 – 59
 - 111- OCHS M.M., MACUSTER M.P., BAINS N., et HANCOCK R.N., (1999). Négative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane porine OPr selective for imipenem and basic amino acids . antimicrobial Agent and Chemotherapy p : 1085 – 1090.
 - 112- OLSEN R.H. and THOMAS D.D. (1973). characteristic and purification of PRR1 and RNA phage specific for the brod hast range *Pseudomonas* R 1822 drug resistance plasmid. J. Virol. 12 : 1560 – 1567.
 - 113- OSANO y., ARAKAWA R., WACHAROT AVANKUN M., OHTA T., HORIL H., ITO F., YOSHIMURA F. and KATO N. (1994). Molecular caracteization of an enterobacterial metallo β lactamse in a clinical isolate of *Serratia marcescens* tha t show imipenem resistance antimicrobial Agent Chemotherapy 34 N°11 p 2200- 2209
 - 114- PALLERONI N. J.(1984). Gene *Pseudomonas* in :Bergey's MANUAL of systematic Bacteriology Vol 1 Kreg N.R. and HALT J.G. ed Williams and Wilkins Co Baltimore.
 - 115- PALLERONI N.J. (1992) Present situation of the taxonomy or aerobic

- Pseudomonas* in *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology* part 3. taxonomy and identification (GALLI E., SILVER S.) American Society For Microbiology Washington D.C. p 105 – 115.
- 116- PANAYOTIS TASSIO T., VASSILIN G., LEMONIA D.K., KAIRS D., KNUTSIA C., ALKIDIS C., LEGATIS N.J. (1997). Multiresistant *Pseudomonas* serogroups O₁₁ outbreak in an intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection* Vol 3 n°6.
- 117- PANZIG B, SCHNEIDER G, PITTEN F.A. and GRUDLING (1999) A large outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in north eastern Germany. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 34 p 415 – 418.
- 118- PARK W , SETO H , HACKENBECK R MATSUHASHI M . (1985) Major peptidoglycan transglycosylase activity in *Streptococcus pneumoniae* that is not a penicillin binding protein . *FEMS Microbiol Lett* 27: 45-48
- 119- PASSARGE E., (1995) Atlas de poche de génétique, ed Flammarion Medecine Sciences
- 120- PECHERE J.C. (1998) L'efflux antibiotique un mécanisme de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Bul. Acad. Nat. Med.* 183 ; n° 3 599-615.
- 121- PETIT A., GERBAUD G., SIROT D., COURVALIN P., SIROT J (1990). Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase. *Antimicrobial Agents Chemother.* 34 : 219 – 224.
- 122- PHILIPPON A. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* Phénotypes de résistance aux antibiotiques *Med Mal. Infect / p* 134 149
- 123- PIDDOCK L.J., NEIL J. MARSHALL (1997) Antibacterial efflux systems *Microbiologie sem*(3) 2°5 – 300.
- 124- PIERRE J, GUTMANN L.(1994) Introduction aux β -lactamines . In : CARBON C; REGNER B; SAIMOT G VILDE J L YENI P eds *Médicaments anti-infectieux* .Paris : Flammarion , 11-26
- 125- PITT T.L. (1988) Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* *Eur.J.clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol 7 ; n° 2 238- 247
- 126- POIREL L; NAAS T; GUIBERT M ; CHAIBI E ; LABIA R ; NORDMANN P (1999) Molecular and Biochemical characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended -Spectrum β -Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. *ANTIMICROBIAL AGENT AND CHEMOTHERAPY* 43 N°3 p 573-581
- 127- QUINN J.R. (1992) Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, in *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology* (GAAIT SILVER eds) An., Soc. Microbial Washington D.C. p 154-160.
- 128- RAHAL K, KEZZAL K,(1983) . *Pseudomonas aeruginosa* -Résistance aux antibiotiques et Epidémiologie- Office des publications universitaires ;111 p

- 129- REIMMAN. C et HAAS D (1986) Is 21 Insertion in the trf A replication control gene of cromosomally integrated plasmid RP1 : a property of stable *Pseudomonas aeruginosa* Hfr strains. Mol. Gen. Gent. 203 : 511 - 519
- 130- ROSSOLINI G.M., FONTANA R. (1999). Carbapenem hydrolyzinh metallo- beta- lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. CLIN. Microbial Infect. Dis Vol 18.
- 131- ROY P H (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. Médecine / Sciences ;13;927-33.
- 132- RUMBAUGH K.P., GRISWOLDT rHAMOOD N. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patterns with tracheal urinary tract and wound infection variation in virulence Factors and virulence. Journal of hospital infection 43 : 211 – 218.
- 133- SAMBROOK J., FRITSH E.F., MANIAHS T.,(1989). Molecular cloning. A laboratory implication. The Journal of infectious diseases A₅₁(3).
- 134- SALAUZE B., BADAQUI H., GHOLIZADEH Y., BURE –ROSLER A. (1997) Epidémie d'infection nosocomiale à *Pseudomonas aeruginosa* de sérotype O11 multirésistant Med. Mal. Infect, 27 RICAL : 658- 662.
- 135- SANDERS CC et SANDERS JR W E (1985) Microbial resistance to newer β -lactam antibiotics :clinical and laboratory implications . J . Infect . Dis ;151,399-406
- 136- SHAW K.J., RATHER P.N., HARE R.S., MILLER G.H.(1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relation ships of the amino glycoside modifying enzymes. Microbial rev. ;57, 138 – 163.
- 137- SHREVE M.R., JOHNSON J.S., MILLA C.E., WIELINSKI L.C. and W E., REGELMANN W E (1996). PCR Ribotyping and Endonuclease subtyping in th Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection . CARE MED Vol 155 p 984 – 989.
- 138- SOUSSY J C (1997) . Etat actuel de la résistance aux antibiotiques.In Médecine thérapeutique ,vol 3, hors série :24-35.
- 139- SOUSSY et al.(2001) Communiqué 2000 – 2001. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- 140- SPENCER R C .(1996) Predominant pathogenes found in the European prevalence of infection in intensive care study EUR J CLIN Microbiol Infect Dis -VOL15:281-5.
- 141- SUTHERLAND R . (1993);Progress in drug research . Birkhauser Velag Basel . 41: 95-148.
- 142- TANKOVIC J., DUVAL J. (1997) Mécanismes d'action des antibiotiques in : Antibiotiques ed John Libbey Eurotext p 37 – 44.

- 143- TRAUB WALTER H., SHNEIDER R., BIGIT L., DIERK BAUER (1998) Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units cluster of noscomial cross infection and encounter of a multiple antibiotic resistant strain chemotherapy 44 : 243 – 259.
- 144- THOMAZ (1979). The mechanism of the irreversible antimicrobial effect of penicilline. Ann. Rev. Microbiol. 33 : 113 – 117.
- 145- VAN HEIJENOORT J (1990) Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : les β -lactamines .In :COURVALIN P DRUGEON H FLANDROIS J P GOLDSTEIN F édés . Bactéricidie . Paris : Maloine,113-137
- 146- VANHOOF R GODARD C NULENS E et al . (1993) Serotypes and extended spectrum β -lactam resistance in aminoglycoside resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from two Belgian general hospitals: a seven year study .J Hosp Infect ;24 :129-138
- 147- VEDEL G. (1995) *Pseudomonas aeruginosa*. Une méthode de detection des phénotypes de résistance aux β - lactamines . laboratoire Glaxo Welcome S.A.
- 148- VEDEL G(1997). La lecture interprétative facteur de maîtrise de l'antibiogramme. Spectra biologie, VOL16, N°85;31-38
- 149- VEYSSIER P.(1999) Aminoglycosides amino cyclitols in Antibiotique agent antibactériens et antifongiques, ed Ellipse p 465 – 478
- 150- VIGNES S. et CARBON C (1995) Pharmacology des antiinfectieux et antiparasitaires . Encyclo. Med. Chir. Paris France , 1-3.
- 151- VU H , NIKAIDO ,(1986) Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase -constitutive *E. cloacae* strain to extended – spectrum β -lactam . Antimicrobial agents and chemotherapy. 27,N°9; p 393 - 398.
- 152- WATINE J ;CHARET J C ;BRUEL A; BOUILLON J P; PALLIEZ J,(1995) .Usefulness of A Computerized Expert System Associated With Systematic O-Serotyping for the early Detection of Outbreaks of hospital Aquired Infections and for the Presumptive Antibiotic Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infections .Société d'Edition de l'Association d'Enseignement Médical des HÔPITAUX DE Paris
- 153- WAXMAN DJ, STROMINGER JL .(1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. Ann Rev Biochem 52: 825-869.
- 154- WEIDMAN B , (1986) Genetic and biochemical basis of resistance of enterobacteriaceae to β -lactam antibiotics . J . of Antimicrobial Chemotherapy . 18, Suppl B , p 31-38.
- 155- WEINBERG E.D. (1986). Iron as factor in disease developement in animales. In Iron siderophore and plant diseases Swin burne, T.R., ed Plenum Press New York.

- 156- WEINBERG E.D. (1995) Acquisition of iron and other nutrient in vivo in virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth I., BOLIN C.A. (ed) Washington D.C. American Society for Microbiology 81 – 95.
- 157- YOSHIMURA F, NIKAIDO H. (1982) Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *Journal of Bacteriology* 152, 636-42.
- 158- YAMANO Y., NISHIKAW T., et KOMATSU Y., (1990). Outer membrane proteins responsible for the penetration of β - lactam and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. the KITAZOTO archives of experimental Medecine Vol 54, n° 2- 3 p 115 – 121.



ANNEXES

Liste des tableaux

Tableau 1	Subdivision de la quatrième édition du Bergey's manual, neuvième édition (1986)	4
Tableau 2	Caractère d'identification des principales espèces de <i>Pseudomonas</i>	7
Tableau 3	Systèmes d'efflux chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Tableau 4	Effets des mécanismes des mécanismes de résistance sur les β -lactamines "antipyocyaniques" (étude effectuée sur 1000 souches différentes isolées en clinique, sauf pour a et b). (VEDEL, 1995)	38
Tableau 5	Concentration et diamètre des zones d'inhibition critiques correspondant à la sensibilité et à la résistance vis à vis des différentes familles d'antibiotiques	54
Tableau 6	Caractères principaux d'identification des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par galerie classique	74
Tableau 7	Résultats de l'identification par système API 20 E	75
Tableau 8	Résultats de l'identification des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par galerie Pasteur- <i>Pseudomonas</i>	77
Tableau 9	Origine et nature des prélèvements	79
Tableau 10	Répartition des sérotypes	81
Tableau 11	Pourcentage de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistantes aux antibiotiques	82
Tableau 12	Caractéristiques des souches isolées	90
Tableau 13	Phénotypes de résistances	100
Tableau 14	CMI en ($\mu\text{g/ml}$) des antibiotiques chez les souches de <i>Pseudomonas</i> isolées	103
Tableau 15	Pourcentage de résistance au β -lactamines des souches de sérotype O11	106
Tableau 16	Catégories de souches productrices de bêta- lactamines	107
Tableau 17	Résultats des transferts génétiques par conjugaison	112
Tableau 18	Résultats des essais de curage plasmidiques par le bromure d'éthidium	113

Liste des figures

Figure 1	Divers agents antimicrobiens et leur action sur le métabolisme bactérien	14
Figure 2	Structure générale des intégrons	20
Figure 3	Classification des β -lactamines	22
Figure 4	Classification des pénams	23
Figure 5	Classification des pénèmes	25
Figure 6	Aztreonam	25
Figure 7	Déterminant génétiques des systèmes d'efflux polyvalents de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figure 8	Schéma de l'hydrolyse enzymatique	40
Figure 9	Classification de 21 β -lactamases identifiées chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon leur séquences en acides aminés	43
Figure 10	Formules chimiques des inhibiteur de β - lactamase	44
Figure 11	Antibiogramme selon le schéma de Vedel	60
Figure 12	Schéma représentant l'antagonisme	61
Figure 13	Schéma d'une image de synergie	62
Figure 14	Ensemencement sur boîtes de sélection	72
Figure 15	Illustration de la production de pigment chez quelques souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figure 16	Illustration de l'identification par galerie API 20 E pour quelques souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figure 17	Illustration de l'identification d'une souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par galerie Pasteur- <i>Pseudomonas</i>	77
Figure 18	Taux de résistance aux antibiotiques chez les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
Figure 19	Résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon le nombre d'antibiotypes	96
Figure 20	Résultats de l'antibiogramme d'une souche résistante aux antibiotiques suivant IMP-AM, CZ, TE, FOX, S, TIC	97
Figure 21	Résultats de l'antibiogramme d'une souche résistante aux antibiotiques suivant : FOX, CAZ, TIC, CF, CFP, PIP, TMP, FOS, E, TE, N.	97
Figure 22	Illustration d'une image de synergie entre une bêta lactamine (carbenicilline) et un aminoside (sisomicine)	98
Figure 23	Mise en évidence de la production de bêta-lactamases par le test PADAC	108
Figure 24	Mise en évidence de la production de bêta-lactamases par le test iodométrique	108
Figure 25	Illustration d'une synergie	110
Figure 26	Profil plasmidique des souches isolées sur gel d'agarose	116
Figure 27	Profil plasmidique de quelque souche de <i>Pseudomonas</i> sur gel d'agarose	115

MILIEUX DE CULTURE

Milieu de Mac Conkey

<u>Composition</u>	g/l
Peptone de caséine	17,0
lactose	10,0
Mélange de sels biliaires	1,5
Chlorure de sodium	5,0
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,01
Agar agar	13,5

Gélose nutritive

<u>Composition</u>	g/l
Macération de viande (eau distillée+extrait de viande)	1 litre
Peptone trypsique	15 g
Na Cl ou KCl	5 g
Agar	15 à 20 g

Milieu Muller – Hinton X

<u>Composition</u>	g/l
Infusion viande bœuf	300,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Gélose	17,0

Milieu King A X

<u>Composition</u>	g/l
Peptone de gélatine	20,0
Glycérol	10,0
Sulfate de potassium anhydre	10,0
Chlorure de magnésium anhydre	1,4
Agar	15,0

Milieu King B X

<u>Composition</u>	g/l
Protéase peptone n°3 ou polypeptone (BBL)	20,0
Glycérol	10,0
Phosphate bipotassique anhydre	1,5
Sulfate de magnésium (7 H ₂ O)	1,5
Agar	15,0

Milieu GSP

<u>Composition</u>	g/l
L(+) glutamate de sodium	10,0
Amidon soluble	20,0
Phosphate monopotassique	2,0
Sulfate de magnésium	0,5
Rouge de phénol	0,36
Agar	12,0

Liste abrégiation

ADP : adénosine diphosphate

ADN : acide désoxy ribonucléique

ARN_t : acide ribonucléique de transfert

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

CMI : concentration minimale inhibitrice

DHPS : dihydroptéroate syntase

DHFR : dihydrofolate réductase

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

NAG : N-acetyl glucosamine

NAM : acide N-acetyl muramique

NNIS : national nosocomial infection society

P_i : phosphate inorganique

PLP : protéine de liaison aux pénicillines

PSE : enzymes spécifique de *Pseudomonas*

UDP : uridine diphosphate

UMP : uridine monophosphate

RESUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est un germe pathogène rentrant, souvent, dans le contexte de maladies graves. C'est aussi, une cause majeure d'infection nosocomiale.

Un total de 100 souches de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé durant la période (1999- 2000) au centre hospitalier de Tlemcen.

La sensibilité aux 31 molécules d'antibiotiques a été réalisée par la technique de diffusion de disque. Ces souches se sont révélées résistantes à la majorité des antibiotiques et plus particulièrement aux β -lactamines. Elles ont cette capacité d'acquérir de nouvelles résistances à des composés habituellement actifs.

24 % des souches produisent une β -lactamase capable d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines.

Le sérotypage a été effectué par le test d'agglutination des antisérums. Ce test permet la détection précoce d'éventuelles épidémies.

La présence de plasmide a été analysée par la méthode d'extraction de Kado et Liu. Les profils plasmatiques ont montré la présence de larges plasmides.

Le transfert par conjugaison a été montré par le passage du plasmide portant le gène déterminant la résistance à l'imipénème (une des molécules les plus actives contre *Pseudomonas aeruginosa*). Le plasmide a été transféré d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* vers *Escherichia coli*.

Les expériences de conjugaison et de curage ont permis de confirmer que cette résistance pourrait avoir comme support l'ADN plasmidique.